

repository.ub.ac.id

**PENGARUH EKSTRAK BIT MERAH
(*Beta vulgaris L*) TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR
ESTROGEN α DAN KETEBALAN ENDOMETRIUM
PADA TIKUS BETINA (*Rattus norvegicus*) YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister



**OLEH :
DEWITA
166070400111011**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

TESIS

PENGARUH EKSTRAK BIT MERAH (*Beta Vulgaris L*) TERHADAP EKPRESI RESEPTOR ESTROGEN α DAN KETEBALAN ENDOMETRIUM PADA TIKUS BETINA (*Rattus Norvegicus*) YANG DIPAPAR ASAP ROKOK

Oleh:
DEWITA
166070400111011

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 27 Juli 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING


Dr. dr. Nurdiana, M. Kes
NIP. 195510151986032001
Ketua


Prof. Dr. dr. Kusworini, M. Kes., SpPK
NIP. 195603311988022001
Anggota

Malang, 01 AUG 2018
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



Dr. dr. Sri Anderini, M. Kes
NIP. 195804141987012001

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK BIT MERAH
(*Beta Vulgaris L*) TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR
ESTROGEN α DAN KETEBALAN ENDOMETRIUM
PADA TIKUS BETINA (*Rattus Norvegicus*) YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

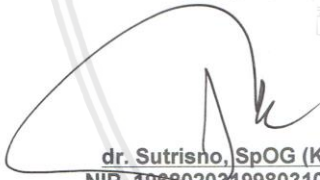
Oleh:
DEWITA
166070400111011

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 27 Juli 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI


Dr. dr. Nurdiana, M. Kes
NIP. 195510151986032001
Ketua


Prof. Dr. dr. Kusworini, M. Kes., SpPK
NIP. 195603311988022001
Anggota Penguji


dr. Sutrisno, SpOG (K)
NIP. 196802031998031005
Anggota Penguji


dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM
NIP. 196701231996011001
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 27 Juli 2018

Mahasiswa,



Nama : Dewita
NIM : 166070400111011
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Alm. Ayahanda dan Ibunda tercinta
Ketiga anak dan suami tersayang
Yang senantiasa memberikan doa dan dukungan

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyajikan tulisan tesis ini dengan judul: Pengaruh Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada Tikus (*Rattus novergicus*) yang Dipapar Asap Rokok.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi tentang ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di program studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di program studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K), selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan

selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

5. DR. dr. Nurdiana, M. Kes selaku ketua komisi pembimbing yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama proses penyusunan tesis ini.
6. Prof. Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp. PK, selaku anggota pembimbing yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama proses penyusunan tesis ini.
7. dr. Sutrisno, SpOG (K) dan dr. Hidayat Sujuti, Ph. D, SpM selaku dewan penguji yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
8. Ibunda, Suami dan keluarga tercinta, yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
9. Seluruh pihak yang telah membantu demi selesainya tesis penelitian ini.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan tesis ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2018

Penulis

RINGKASAN

DEWITA

Pengaruh Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Asap Rokok. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Anggota: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK.

Asap rokok mengandung 4000 zat kimia yang berbahaya bagi kesehatan yang beresiko tinggi terserang penyakit jantung, dan kanker endometrium. Selain itu asap rokok mempengaruhi kesehatan reproduksi wanita, hal ini diduga dapat menyebabkan terjadi penurunan kesuburan pada wanita. Infertilitas merupakan masalah kesehatan yang sangat sensitif bagi pasangan usia subur terutama wanita, ini disebabkan oleh berbagai faktor. Penelitian menyebutkan bahwa betalain mempunyai antioksidan tinggi yang mampu mencegah terjadi kerusakan oksidatif pada struktur DNA, lipid, dan protein.

Penelitian ini merupakan *true experimental* dengan Rancangan acak lengkap dan *post test only with control group design*. Sampel berjumlah 25 ekor tikus betina dibagi 5 kelompok secara acak dengan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (paparan asap rokok), kelompok PI (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari), kelompok PII (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dosis 250 mg/KgBB/hari), dan kelompok PIII (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dosis 500 mg/KgBB/hari). Perlakuan dilakukan selama 56 hari di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan memberikan paparan asap rokok kretek 2 batang/hari pagi dan sore melalui *smoking pump* dan diberi ekstrak Bit merah peroral menggunakan sonde. Kemudian dilakukan pembedahan pada saat fase proestrus dan dilakukan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen α dengan imunohistokimia dan ketebalan endometrium dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE).

Hasil penelitian pada kelompok kontrol positif menghasilkan penurunan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium. Pada kelompok perlakuan setelah diberi ekstrak Bit merah terjadi peningkatan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium dibandingkan kelompok kontrol.

Penelitian menghasilkan penurunan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan oleh asap rokok mempengaruhi penurunan hormon estradiol sehingga terjadi penurunan ekspresi reseptor estrogen α di endometrium tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang berakibat terhambatnya pertumbuhan sel folikel ovarium sehingga terjadi penurunan ketebalan endometrium. Disamping itu asap rokok Artinya asap rokok menyebabkan ROS meningkat sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi akibat tidak seimbangnya antioksidan dan ROS, sehingga diperlukan antioksidan dari luar tubuh. Pemberian ekstrak Bit merah pada tikus betina terbukti dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium, hal ini diketahui bahwa Bit merah mengandung antioksidan tinggi. Ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terbukti meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang di papas asap rokok.

SUMMARY

DEWITA

Effects of Red Bit Extract (*Beta vulgaris* L) on Expression Estrogen α and Thickness of Endometrium in Female Rat (*Rattus norvegicus*) exposed to cigarette smoke. Master of Midwifery Program Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Chair of Supervising Commission: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Members: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK.

Cigarette smoke contains 4000 chemicals that are harmful to health that are at high risk of heart disease, and endometrial cancer. In addition cigarette smoke affects the reproductive health of women, it is thought to cause a decline in fertility in women. Infertility is a very sensitive health problem for couples of childbearing age especially women, this is caused by various factors. Research suggests that betalain has a high antioxidant that is able to prevent oxidative damage to the structure of DNA, lipids, and proteins.

This study is true experimental with complete randomized Design and post test only with control group design. The samples were 25 rats divided into 5 groups randomly with negative control group, positive control group (exposure to cigarette smoke), PI group (exposure to cigarette smoke + red Bit extract dose 125 mg / KgBB / day), PII group (exposure to cigarette smoke + red bits extract dose 250 mg / KgBB / day), and group PIII (exposure smoke + extract Red bits dose 500 mg / KgBB / day). The treatment was conducted for 56 days in pharmacology laboratory of Medical Faculty Universitas Brawijaya by giving exposure of kretek smoke 2 stem / morning and afternoon through smooking pump and given extract of red bite peroral using sonde. Then performed surgery during the proestrus phase and examined the expression of estrogen receptor α with immunohistochemical and endometrial thickness with Hematoxyline Eosin (HE) staining.

The study results in the positive control group resulted in decreased expression of estrogen α receptors and endometrial thickness. In the treatment group after being given extract Red bits increased expression of estrogen α receptor and endometrial thickness compared to control group.

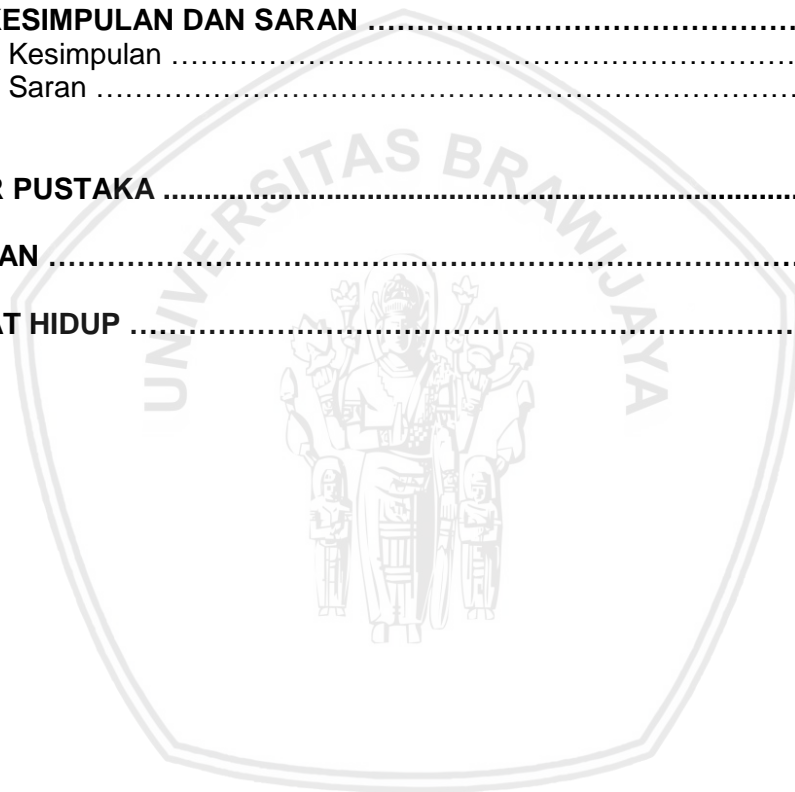
The study resulted in decreased expression of estrogen α receptor and endometrial thickness compared with the negative control group. This is caused by cigarette smoke affect the decrease of estradiol hormone so that decrease expression of estrogen α receptor in endometrium of female rat (*Rattus Norvegicus*) which resulted in inhibition of growth of ovarium follicle cells resulting in decreased thickness of endometrium. Besides cigarette smoke This means that cigarette smoke causes ROS increased so that oxidative stress occurs. Oxidative stress occurs due to unbalanced antioxidants and ROS, so it takes antioxidants from outside the body. Giving red bits extract on female rats proved to increase expression of estrogen α receptor and thickness of endometrium, it is known that red bite contains high antioxidant. Red Bit Extract (*Beta vulgaris* L) proved to increase expression of estrogen α receptor and endometrial thickness in *Rattus norvegicus* female rats in smoke exposure.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1. Manfaat Teoritis	6
1.4.2. Manfaat Praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Rokok	8
2.1.1. Komponen Rokok	9
2.1.2. Fase Rokok	11
2.1.3 Pengaruh Rokok Paparan Asap rokok Terhadap Organ Reproduksi Wanita.....	11
2.2 Infertilitas	12
2.3 Radikal Bebas dan Stres Oksidatif	13
2.4 Antioksidan	15
2.5 Endometrium	16
2.5.1 Definisi Endometrium	16
2.5.2 Siklus Endometrium	17
2.6 Estrogen dan Reseptor Estrogen	19
2.7 Bit Merah (<i>Beta Vulgaris L</i>)	22
2.7.1 Klasifikasi Bit merah (<i>Beta vulgaris L</i>)	24

2.7.2 Betalain	25
2.8 Biologi Reproduksi Tikus Betina (<i>Rattus norvegicus</i>)	27
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN	31
3.1 Kerangka Teori	31
3.1.1 Keterangan Kerangka Teori	32
3.2 Kerangka Konsep	34
3.2.1 Keterangan Kerangka Konsep	35
3.2 Hipotesis Penelitian	36
BAB 4 METODE PENELITIAN	37
4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.3. Sampel Penelitian	37
4.4. Besar Sampel	38
4.5. Variabel Penelitian	38
4.6. Definisi Operasional	39
4.7. Prosedur Penelitian	40
4.7.1 Persiapan Hewan Coba	40
4.7.2. Pemaparan Rokok Pada Tikus	41
4.8 Pemberian Ekstrak Bit merah	42
4.8.1 Ekstrak Bit merah dengan Pelarut Etanol	42
4.8.2 Pengenceran Ekstrak Bit Merah	44
4.9 Pewarnaan Preparat Apusan Vagina.....	45
4.10 Prosedur Pengambilan organ	46
4.11 Pembuatan Sediaan Histopatologi	47
4.12 Pengamatan Histopatologi	48
4.13 Teknik Analisa Data	54
4.14 Alur Penelitian	56
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	57
5.1 Karakteristik Subjek Penelitian	57
5.1.1 Hasil Pengamatan Ekspresi Reseptor estrogen α Pada Tikus Betina yang Dipapar Asap rokok dan diberi Ekstrak Bit merah	58
5.1.2 Hasil Pengamatan Ketebalan Endometrium Pada Tikus Betina yang Dipapar Asap rokok dan diberi Ekstrak Bit Merah	59
5.2 Hasil Uji Prasyarat Parametrik	60
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit Merah	60
5.3 Hasil Uji Perbandingan Antar Kelompok Kontrol	61
5.3.1 Hasil Uji t Sampel Bebas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium antar Kelompok Kontrol negatif dan Kontrol Positif	61
5.4 Hasil Uji Perbandingan Antar Kelompok Perlakuan	63
5.4.1 Hasil Uji <i>Oneway Annova</i> dan Uji LSD Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit merah	63
5.5 Hasil Uji Korelasi	71

5.5.1 Hasil Uji Korelasi Peningkatan Dosis Ekstrak Bit Merah Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus yang Dipapar Asap Rokok	71
BAB 6 PEMBAHASAN	75
6.1 Pengaruh Ekstrak Bit Merah (<i>Beta vulgaris L</i>) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α pada Tikus Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipaparasap rokok	75
6.2 Pengaruh ekstrak Bit merah (<i>Beta vulgaris L</i>) terhadap ketebalan endometrium pada tikus betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar asap rokok	80
6.3 Keterbatasan Penelitian	84
6.4 Implementasi Kebidanan	84
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	85
7.1 Kesimpulan	85
7.2 Saran	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN	92
RIWAYAT HIDUP	108



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Definisi Operasional	39
Tabel 5.1 Uji Normalitas Data Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium	60
Tabel 5.2 Uji Homogenitas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium	61
Tabel 5.3 Uji t Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan endometrium	62
Tabel 5.4 Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium	63
Tabel 5.5 Perbandingan Kelompok Kontrol dan Perlakuan Ketebalan Endometrium	67
Tabel 5.6 Uji Korelasi Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium	71

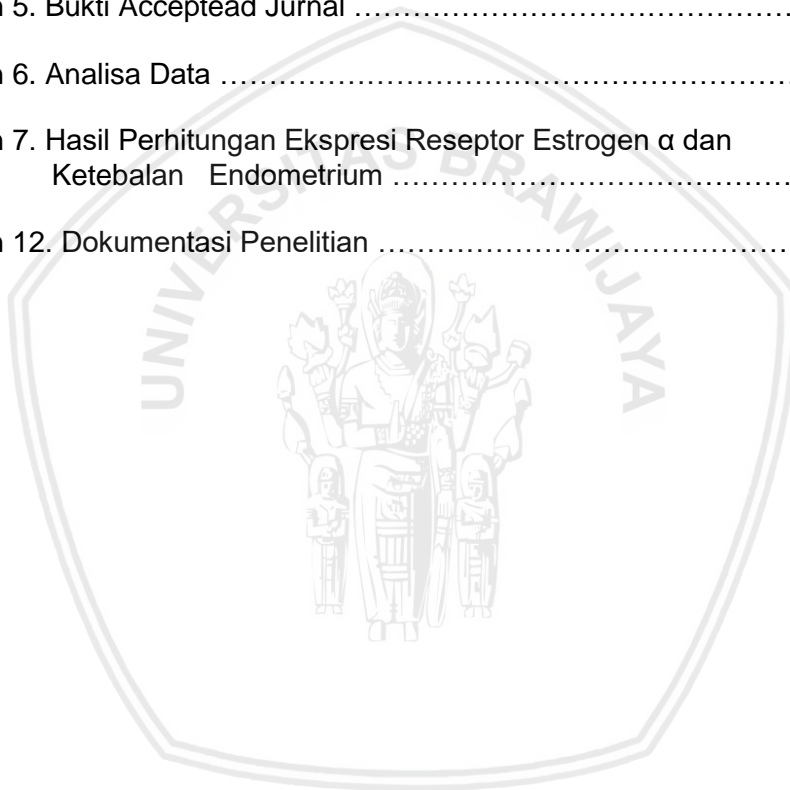


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Stres Oksidatif Terhadap Organ Reproduksi.....	14
Gambar 2.2 Siklus Endometrium	17
Gambar 2.3 Tipe-tipe Estrogen.....	20
Gambar 2.4 Bit Merah (Beta Vulgaris L)	23
Gambar 2.5 Senyawa kimia Bit Merah.....	24
Gambar 2.6 Struktur Kimia betalain	25
Gambar 2.7 Kerangka Teori	31
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	34
Gambar 4.1 Alur Penelitian	56
Gambar 5.1 Hasil Penelitian Ekspresi Reseptor Estrogen α	58
Gambar 5.2 Hasil Penelitian Ketebalan Endometrium	59
Gambar 5.3 Histogram Rerata Ekspresi Reseptor Estrogen α	66
Gambar 5.4 Histogram Rerata Ketebalan Endometrium	70
Gambar 5.5 Grafik Dosis Bit merah dengan Ekspresi Reseptor Estrogen α	72
Gambar 5.6 Grafik Dosis Bit Merah dengan Ketebalan Endometrium	72
Gambar 5.7 Grafik Dosis Bit merah dengan Ekspresi Reseptor α dan Ketebalan Endometrium	73

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik	92
Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi	93
Lampiran 2. Surat Keterangan Penelitian Labaratorium Farmakologi	94
Lampiran 3. Surat Keterangan Penelitian Laboratorium Patologi Anatomi	95
Lampiran 4. Surat Keterangan Pembacaan HE dan IHK	96
Lampiran 5. Bukti Acceptead Jurnal	97
Lampiran 6. Analisa Data	98
Lampiran 7. Hasil Perhitungan Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium	105
Lampiran 12. Dokumentasi Penelitian	106



DAFTAR SINGKATAN

ATP	: Adenosina trifosfat
BaP	: Benzoapyrene
BNT	: Beda Nyata Terkecil
CAT	: Catalase
COOX-2	: Cyclooxygenase 2
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
E1	: Estron
E2	: 17 β -Estradiol
E3	: Estriol
ERE	: Estrogen Responsive Element
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GPx	: Glutathione peroxidase
HCN	: Hidrogen sianida
H ₂ O ₂	: Hidrogenperoksida
HE	: Hematosiklin Eosin
IHC	: Immunohistochemistry
IP	: Intra Pritoneal
LH	: Luteinizing Hormone
LSD	: Least Significant Different
mRNA	: messenger RNA
O ₂ [·]	: Superoksida
OH [·]	: Hidroksil
PAHs	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBS	: Phospat Buffered Saline
Px	: Prosesus Xypoideus

RE	: <i>Reseptor Estrogen</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygene Species</i>
RO [•]	: <i>Peroxyl</i>
SKM	: <i>Sigaret Kretek Mesin</i>
SKT	: <i>Sigaret Kretek Tangan</i>
SSP	: <i>Sistem Saraf Pusat</i>
SOD	: <i>Super Okside Dismutase</i>
TAF	: <i>Transcriptional Activation Function</i>
TPM	: <i>Total Particulate Matter</i>
TSNA	: <i>Tobacco spesific nitrosamine</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



RIWAYAT HIDUP

Dewita, lahir di Lhokseumawe, 10 Januari 1980, anak pertama dari empat bersaudara, putri dari Alm Bapak M. Nasir dan Ibu Maimunah Simatupang. Lulus SD Negeri Blang Tambue tahun 1991, lulus SMP Negeri 2 Samalanga tahun 1994, dan lulus MA Jeumala Amal Lueng Putu tahun 1997. Melanjutkan pendidikan DIII Kebidanan di Akademi Kebidanan Mona Banda Aceh, lulus tahun 2001. Melanjutkan pendidikan program studi DIV Bidan Pendidik di Universitas Sumatera Utara Medan, lulus tahun 2008. Pada tahun 2016 mengambil pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2003-2013 pernah bekerja sebagai staf di Dinas Kesehatan Aceh Tamiang. Tahun 2013 sampai sekarang penulis bekerja sebagai dosen di Prodi DIII Kebidanan Kota Langsa Poltekkes Kemenkes Aceh.



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut WHO, jumlah perokok di dunia mencapai 1,2 milyar orang dan 800 juta orang terdapat di negara-negara berkembang. Di Indonesia jumlah perokok berada urutan ketiga dunia setelah negara Cina dan India, sehingga berpengaruh pada kenaikan angka kesakitan dan kematian akibat rokok. Pada tahun 2007 – 2013 masyarakat Indonesia yang merokok mengalami peningkatan sebesar 23,7 % - 24,3 % (Depkes RI, 2014).

Asap rokok terdapat 4000 zat kimia berbahaya bagi kesehatan sehingga beresiko tinggi terkena penyakit jantung, dan kanker endometrium (Zhou *et al*, 2011). Selain itu asap rokok mempengaruhi kesehatan reproduksi wanita yang berhubungan terjadi penurunan kesuburan pada wanita (Camlin *et al*, 2014). Paparan asap rokok mempunyai 2 sifat yaitu, aktif dan pasif, serta jenis asap rokok yang terhirup memiliki asal yang berbeda. Perokok aktif (*mainstream*) adalah perokok utama yang menghirup asap pada setiap hembusan. Sedangkan perokok pasif merupakan asap rokok sampingan (*sidestream*) yang dihirup pada saat perokok utama membakar, menyalakan dan asapnya yang dihirup oleh perokok pasif (Talbot and Riveles, 2005). Dampak asap rokok pada perokok aktif memiliki resiko yang sama dengan perokok pasif dapat menyebabkan infertilitas (Neal *et al*, 2005).

Infertilitas merupakan masalah kesehatan yang sangat sensitif bagi pasangan usia subur terutama wanita, ini disebabkan oleh berbagai faktor. Secara epidemiologi faktor resiko infertilitas dipengaruhi oleh ekonomi, gaya hidup dan lingkungan. Faktor resiko yang paling tinggi terjadinya infertilitas disebabkan oleh

asap rokok. Menurut Olooto *et al* (2012), menyebutkan bahwa 10-15 % pasangan suami istri didunia mengalami infertilitas. Negara Afrika memiliki angka prevalensi infertilitas sangat tinggi sebesar 20-60 %. Begitu juga di negara-negara Asia angka prevalensi kejadian infertilitas mencapai 30,8% di Kamboja, 10% di Kazakhtan, 43,7% di Turkmenistan, dan 21,3% di Indonesia (POGI, 2013). Penyebab infertilitas adalah terjadinya gangguan ovulasi, penyumbatan saluran tuba, dan adanya gangguan hormon estrogen pada wanita. Hal ini terjadi karena stres oksidatif atau radikal bebas pada organ reproduksi wanita (Naserzadeha *et al*, 2014).

Dalam penelitian Lee *et al* (2017) pada tikus betina, paparan asap rokok dapat mempengaruhi kerusakan folikel di ovarium dan menghambat pertumbuhan proliferasi sel di endometrium sehingga terjadi apoptosis. Pemberian nikotin pada tikus, terbukti dapat merubah histologi uterus dan saluran sel telur yang dipengaruhi oleh menurunnya kadar hormon estradiol sehingga ekspresi reseptor estrogen α juga menurun (Seyedeh *et al*, 2014). Pengaruh paparan asap rokok tidak hanya beresiko terhadap perokok utama, namun beresiko terhadap non perokok (perokok pasif) yang berada disekitar perokok utama yang dapat berefek negatif pada kesehatan reproduksi.

Paparan asap rokok berpengaruh terjadinya stres oksidatif di endometrium sehingga menghambat proliferasi sel melalui jalur nitrit oksid dan mengakibatkan terjadi gangguan siklus menstruasi. Selain itu nikotin, karbonmonoksida dan *benzo(a)pyrine* juga dapat menurunkan proliferasi sel di endometrium, yang berakibat terjadi penurunan ketebalan endometrium (Khorram *et al*, 2010). Menurut Tuttle *et al* (2009), kandungan *benzo(a)pyrine* dalam asap rokok mempengaruhi penurunan hormon estradiol sehingga menyebabkan hilangnya atau menurunnya pertumbuhan sel folikel di ovarium melalui apoptosis.

ROS (*Reactive Oxygen Species*) dihasilkan dari proses oksidasi kimia tubuh manusia baik secara fisiologis maupun patologis. ROS yang patologis menyebabkan terjadinya penyakit pada manusia. Apabila ROS dan antioksidan mengalami ketidakseimbangan, maka dapat terjadi stres oksidatif. Sumber ROS ada 2 kelompok yaitu endogen dan eksogen. Sumber ROS endogen dihasilkan pada organel seluler seperti mitokondria, *perexisome*, dan sitokrom. Sedangkan sumber ROS eksogen dihasilkan dari polusi udara, tembakau, asap rokok, obat-obatan, *xenobiotik*, radiasi dan lain-lain (Prasad *et al*, 2017).

Endometrium merupakan lapisan bagian terdalam rongga uterus. Ketebalan dinding rahim terjadi akibat perubahan siklus dan terjadi pelepasan lapisan dinding rahim pada saat menstruasi. Lapisan endometrium ada dua lapisan, yaitu lapisan fungsionalis pada saat menstruasi dan lapisan basalis yang menempel pada miometrium. Endometrium mempunyai peran penting dalam implantasi embrio dan sebagai tempat pertumbuhan plasenta (Rzymiski *et al*, 2014).

Reseptor estrogen merupakan reseptor hormon golongan steroid, yang dimediasi oleh estrogen didalam inti sel, kemudian terjadi ekspresi reseptor estrogen dan berikatan dengan DNA dalam organ reproduksi. Reseptor estrogen terdiri dari dua sub tipe, yaitu reseptor estrogen α dan reseptor estrogen β . Kedua reseptor estrogen ini ditemukan pada lokalisasi dan konsentrasi yang berbeda (Hiroi *et al*, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Suardi (2016) pada tikus menunjuk ekstrak kacang panjang mampu meningkatkan hormon estrogen sehingga jumlah kelenjar dan ketebalan endometrium juga mengalami peningkatan. Apabila estrogen meningkat maka reseptor estrogen pada endometrium juga meningkat.

Penelitian Ratnawati *et al* (2014), pemberian alfa *tocopherol* pada tikus betina yang dipapar asap rokok, terbukti dapat mencegah stres oksidatif yang ditandai

dengan meningkatnya hormon estrogen dan ketebalan endometrium. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa pigmen antosianin dari ubi jalar ungu terbukti efektif mencegah stres oksidatif ditandai meningkatnya ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok. Penulis berasumsi bahwa hal tersebut dapat menangkal radikal bebas pada endometrium sehingga dapat mencegah terjadinya infertilitas (Utami, 2016).

Senyawa yang dapat menyelamatkan tubuh dari bahaya radikal bebas adalah antioksidan. Berdasarkan sumbernya antioksidan diklasifikasikan menjadi 2 yaitu, antioksidan dalam tubuh dan dari luar tubuh manusia. Sumber antioksidan dihasilkan dari dalam tubuh yaitu, *Superoksida Dismutase* (SOD), *Catalase* (Cat), dan *glutathione peroksidase* (Gpx). Sedangkan sumber antioksidan yang didapat dari luar tubuh yaitu dari tumbuhan yang memiliki sifat mirip antioksidan. Misalnya vitamin C, vitamin E, α -tocopherol, flavonoid, niasin, *phycocyanin*, dan lain-lain (Werdhasari, 2014). Salah satu sumber antioksidan banyak terdapat pada Bit merah (*Beta vulgaris L*), adalah senyawa aktif betalain.

Senyawa Betalain merupakan pigmen mengandung nitrogen yang dapat larut air. Bit merah terdapat senyawa aktif betalain (Clifford *et al*, 2015). Senyawa betalain disebut juga dengan asam betalamat dan turunannya *betacyanin* dan *betaxanthin* (Merreddy *et al*, 2016). Betalain juga umum digunakan sebagai pewarna alami untuk pengolahan pangan. Betalain memiliki sifat sebagai antioksidan, sehingga mampu melindungi komponen tubuh dari gangguan stres oksidatif (Ninfali & Angelino, 2013). Senyawa betalain dalam Bit merah mempunyai antioksidan lebih besar yaitu 1-2 kali lipat dari antosianin (Gengatharan *et al*, 2015).

Senyawa betalain memiliki persamaan dan perbedaan dengan antosianin. Persamaan betalain dan antosianin adalah memiliki sifat larut air, berasal dari

tumbuhan yang menghasilkan zat berwarna. Sedangkan perbedaan betalain dengan antosianin yaitu betalain mengandung nitrogen berasal dari tirosin yang terdapat pada tanaman, namun antosianin tidak memiliki nitrogen. Tumbuhan yang memiliki senyawa antosianin adalah kubis ungu (*brassica oleracea*), ubi ungu (*Ipomea batatas*), bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*), bunga sepatu (*Hibiscus rosasinensis*). Tumbuhan yang memiliki senyawa betalain terdapat pada bit merah (*Beta vulgaris L*), buah naga merah (*Red pitahaya*), buah kaktus berduri (*prickly pear*), dan bayam merah (*amanrathus tricolor L*) (Gengatharan *et al*, 2015).

Senyawa kimia dari Bit merah yaitu asam askorbat, karetenoit, asam fenolik, betalain, dan favonoid. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa betalain memiliki antioksidan tinggi dan anti inflamasi secara invivo dan invitro pada beberapa model hewan coba. Suplemen Bit merah dapat mencegah kerusakan oksidatif pada struktur DNA, lipid, dan protein secara in vitro. Bit merah terbukti dapat mencegah hipertensi, diabetes dan peradangan dalam tubuh manusia (Clifford *et al*, 2015; Indu *et al*: 2017).

Berbagai penelitian telah dilakukan, bahwa ekstrak Bit merah memiliki fungsi sebagai antioksidan, anti kanker, antimikroba, anti malaria dan anti inflamasi (Vulic *et al*, 2013; Gengatharan *et al*, 2015). Berdasarkan uraian diatas, penulis bermaksud untuk membuktikan pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk membuktikan pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
- b. Untuk membuktikan pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan bagi peneliti selanjutnya dan menambah wawasan ilmiah tentang manfaat Bit merah (*Beta vulgaris L*) sebagai antioksidan serta pengaruh terhadap kesehatan reproduksi wanita yang terpapar asap rokok terhadap kejadian infertilitas.

1.4.2 Manfaat praktis

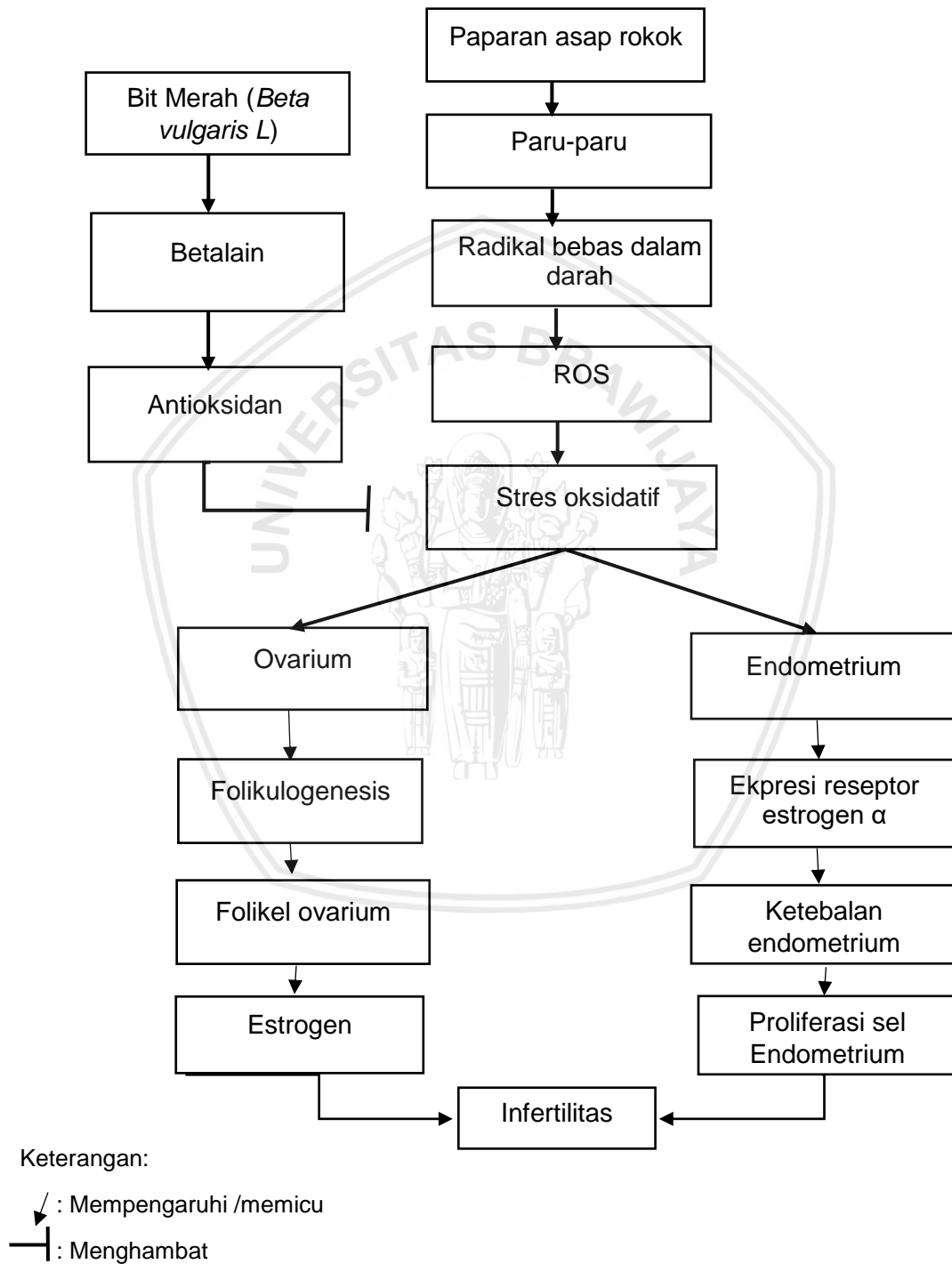
Penelitian Bit merah (*Beta vulgaris L*) diharapkan dapat dimanfaatkan oleh masyarakat luas sebagai antioksidan untuk mencegah terjadi infertilitas pada organ reproduksi wanita yang terpapar asap rokok.



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 2.7 Pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

3.1.1 Keterangan Kerangka Teori

Pengaruh paparan asap rokok tidak hanya beresiko terhadap perokok itu sendiri (perokok utama), namun beresiko terhadap non perokok (perokok pasif) yang berada disekitar perokok utama yang memberi efek negatif pada kesehatan reproduksi. Stres oksidatif adalah terjadi ketidakseimbangan antara ROS (radikal bebas) dan oksidan. Stres oksidatif dapat menimbulkan kerusakan lipid, protein, dan asam nukleat. Stres oksidatif jangka pendek dapat terjadi pada jaringan yang mengalami trauma, infeksi, Inflamasi, hipoksia, toksis, dan olahraga berlebihan. Enzim yang banyak menghasilkan radikal bebas yaitu *xanthine oxidase*, *lipogenase*, *cyclooxygenase* melalui aktivasi fagosit melepaskan ion-ion tembaga, terjadi gangguan pada rantai transpor elektron dari fosforilasi oksidatif, sehingga produksi ROS berlebihan (Lobo *et al*, 2010).

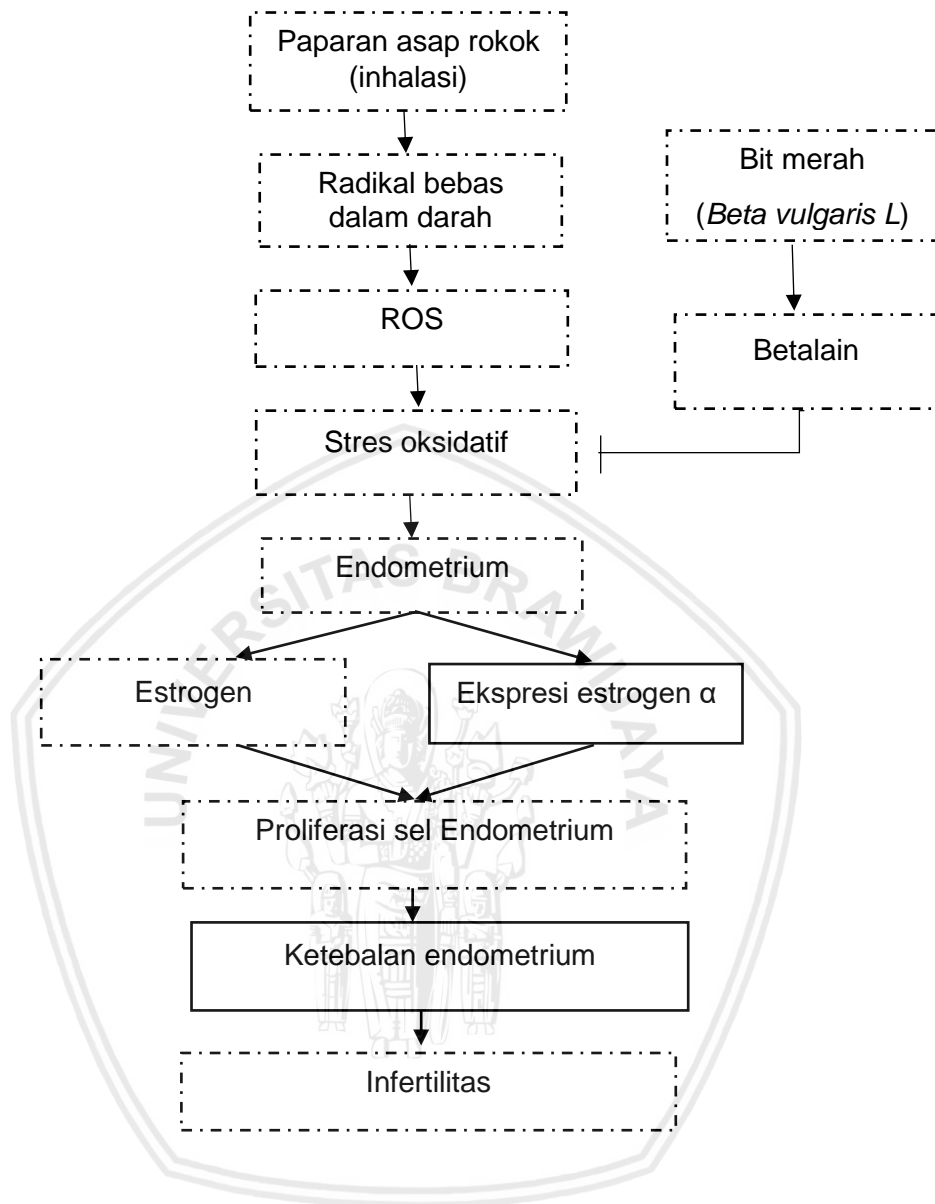
Pengaruh paparan asap rokok menyebabkan stres oksidatif di endometrium sehingga menghambat proliferasi sel melalui jalur nitrit oksid mengakibatkan terjadi gangguan siklus menstruasi. Selain itu nikotin, karbonmonoksidan dan *benzo(a)pyrine* juga menurunkan proliferasi sel di endometrium, yang berakibat terjadi penurunan ketebalan endometrium (Khorram *et al*, 2010). Kandungan *benzo(a)pyrine* dalam asap rokok mempengaruhi penurunan hormon estradiol menyebabkan hilangnya atau menurunnya pertumbuhan sel folikel di ovarium melalui apoptosis (Tuttle *et al*, 2009).

Untuk menetralsir ROS berlebihan dalam tubuh maka dibutuhkan antioksidan. Antioksidan yaitu senyawa mampu menghambat jenis oksigen reaktif dan nitrogen reaktif, dan radikal bebas lain sehingga dapat terhindar dari berbagai penyakit. Penelitian oleh Ratnawati *et al* (2014), pemberian alfa *tocopherol* pada tikus betina yang dipapar asap rokok, terbukti dapat mencegah stres oksidatif yang ditandai dengan meningkatnya hormon estrogen dan

ketebalan endometrium. Selain itu pigmen antosianin dari ubi jalar ungu terbukti efektif mencegah stres oksidatif dengan meningkatnya ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok. Penulis berasumsi bahwa hal tersebut dapat mencegah terjadinya infertilitas (Utami, 2016).



3.2 Kerangka Konsep



Keterangan:

- : Variabel yang diteliti
- : Variabel yang tidak diteliti
- : Mempengaruhi/memicu
- : Menghambat

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Pengaruh Ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

1.2.1 Keterangan Kerangka Konsep

Paparan asap rokok terdapat zat kimia yang membahayakan kesehatan reproduksi wanita, karena asap rokok mengandung efek toksisitas pada ovarium. Apabila terpapar asap rokok maka diduga akan terjadi infertilitas, onset menopause dini, kerusakan folikel ovarium, angiogenesis dan ketebalan endometrium. Asap rokok dapat menyebabkan ROS meningkat sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi karena ketidakseimbangan antioksidan dan ROS, oleh sebab itu dibutuhkan antioksidan dari luar tubuh untuk menyeimbangkan keduanya.

Penelitian menunjukkan bahwa paparan asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif di ovarium sehingga menurunkan jumlah sel folikel di ovarium melalui jalur apoptosis. Menurut Lee *et al* (2017), tikus yang dipapar asap rokok dapat dapat mengurangi jumlah sel folikel ovarium dan menghambat proliferasi sel di endometrium yang menyebabkan ketebalan endometrium menipis.

Kandungan nikotin dalam asap rokok menyebabkan apoptosis meningkat pada epitel rahim dan saluran telur, yang dapat mengurangi konsentrasi estradiol dan ekspresi reseptor estrogen α menurun. Secara epidemiologi wanita perokok aktif akan mengalami penurunan kadar estrogen dibandingkan wanita yang bukan perokok. Hal ini terjadi karena peningkatan metabolisme *hepatic* estrogen oleh asap rokok yang memiliki efek menurunkan estrogen. Bila hormon estrogen rendah maka terjadi penurunan rangsangan sel-sel endometrium sehingga diduga dapat terjadi kanker endometrium.

Untuk menetralkan ROS berlebihan dalam tubuh maka dibutuhkan antioksidan. Antioksidan yaitu senyawa yang menghambat jenis oksigen reaktif, jenis nitrogen reaktif, dan radikal bebas lain sehingga dapat mencegah terjadinya berbagai penyakit. Penelitian oleh Ratnawati *et al* (2014), pemberian alfa

tocopherol pada tikus betina yang dipapar asap rokok, terbukti dapat mencegah stres oksidatif yang ditandai dengan meningkatnya hormon estrogen dan ketebalan endometrium. Selain itu pigmen antosianin dari ubi jalar ungu terbukti efektif mencegah stres oksidatif dengan meningkatnya ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok. Penulis berasumsi bahwa hal tersebut dapat mencegah terjadinya infertilitas (Utami, 2016).

Dalam penelitian ini antioksidan yang diberikan berasal dari Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang mempunyai senyawa aktif betalain. Dari hasil berbagai penelitian kandungan betalain dari Bit merah mengandung antioksidan yang tinggi sehingga mampu menangkal radikal bebas dalam tubuh. Bit merah mengandung senyawa kimia diantaranya, asam askorbat, karotenoid, asam fenolik, betalain, dan favonoid. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa betalain memiliki antioksidan yang tinggi dan anti inflamasi secara *invivo* dan *invitro* pada beberapa model hewan coba. Suplemen bit merah dapat mencegah kerusakan oksidatif pada struktur DNA, lipid, dan protein secara *in vitro*. Bit merah juga terbukti dapat mencegah hipertensi, diabetes dan peradangan dalam tubuh manusia (Clifford *et al*, 2015; Indu *et al*: 2017).

1.3 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) dapat meningkatkan ketebalan endometrium tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan acak lengkap dan *post test only with control group design*. Penelitian *true experimental* bertujuan untuk menginvestigasi hubungan sebab akibat dan membandingkan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Sedangkan *post test only with control group design* merupakan rancangan penelitian dilakukan pengujian setelah memberi perlakuan (Hanafiah, 2012).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada 3 tempat, yaitu Laboratorium Materia Medika Kota Batu Malang dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*), serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pembuatan slide histopatologi (pemeriksaan ketebalan endometrium dan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen α). Waktu dan pelaksanaan penelitian dimulai bulan Januari - Maret 2018 selama 8 minggu proses memberikan perlakuan, diawali 7 hari untuk aklimatisasi tikus betina (*Rattus norvegicus*), dan selanjutnya untuk menganalisa data.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) strain wistar diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Tikus betina putih dipilih untuk penelitian ini karena mudah dipelihara, bentuk organ dan proses biokimia dan biofisik mempunyai banyak kemiripan dengan manusia, hewan ini cocok digunakan untuk berbagai penelitian. Kriteria inklusi yakni tikus strain wistar, berjenis kelamin betina, berusia 2-3 bulan, berat badan 120-200 gram, sehat dan tidak cacat secara anatomi. Sedangkan kriteria

eksklusi yaitu tikus cacat secara anatomi, tikus mati pada saat penelitian dan tikus yang sudah pernah digunakan pada penelitian yang lain.

4.4 Besar Sampel

Sampel penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Besar sampel setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus replikasi/ulangan (Hanafiah, 2012) dengan rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$\{(t-1)(r-1)\} \geq 15$$

$$\{(5-1)(r-1)\} \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19 : 4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}$$

$$r \geq 5$$

Keterangan:

t: Jumlah Perlakuan

r: Jumlah replikasi/ulangan

Jadi sampel yang ditetapkan sebanyak 5 sampel untuk setiap kelompok dan jumlah keseluruhan 25 ekor tikus betina untuk 5 kelompok. Namun untuk menghindari kemungkinan sampel mati, maka sampel dilebihkan 1 ekor tikus betina putih untuk setiap kelompok. Jadi jumlah sampel semuanya 30 ekor tikus betina putih.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diukur, yaitu:

1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel independen atau bebas, yaitu ekstrak Bit merah (*Beta vulagaris L*) dan paparan asap rokok.

2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel dependen atau terikat, yaitu ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Ukur
Ekstrak Bit merah (<i>Beta vulgaris</i> L)	Ekstrak Bit merah mengandung banyak antioksidan berasal dari senyawa betalain, yang diperoleh dari proses maserasi Bit Merah dengan menggunakan larutan etanol 90%. Ekstrak Bit merah diberikan peroral dengan sonde yaitu dosis 125 mg/kgBB/hari, 250 mg/kgBB/hari, dan 500 mg/KgBB/hari (Gamal <i>et al</i> , 2014).	Rasio
Asap rokok	Asap rokok merupakan asap yang didapat melalui pembakaran rokok kretek menggunakan <i>smoking pump</i> . Rokok yang digunakan adalah rokok Trubus Tulung Agung dengan kandungan tar 44,30 mg/batang dan nikotin 2,90 mg/batang. Asap rokok dipaparkan pada tikus betina selama 8 minggu sebanyak 2 batang/hari dengan waktu pemberian 1 batang pagi hari dan 1 batang sore hari (Ratnawati <i>et al</i> , 2014).	
Ekspresi Reseptor Estrogen α	Ekspresi reseptor estrogen α di endometrium tikus betina dideteksi menggunakan antibodi ER α (D-12): sc-8005, dengan metode imunohistokimia. Pengamatan ekspresi reseptor estrogen α menggunakan foto mikroskop OLYMPUS XC10 pada 10 lapang pandang dengan pembesaran 400 x dan dihitung secara manual. Ekspresi reseptor estrogen α dapat diamati pada inti sel yang terekspresi berwarna coklat. Data yang didapatkan dengan menghitung sel-sel yang terekspresi reseptor estrogen α kemudian dijumlahkan menggunakan <i>cell count</i> .	Rasio
Ketebalan Endometrium	Ketebalan endometrium diukur pada fase proestrus dengan menghitung rerata ukuran tebal tertinggi dan tebal terendah sebanyak 10 titik yaitu 5 titik tebal tertinggi dan 5 titik tebal terendah pada sayatan transversal dengan satuan μm . Metode yang digunakan dengan pewarnaan <i>Hemotoksiklin Eosin</i> (HE) dan dihitung dengan menggunakan Dot slide mikroskop pencahayaan Olympus XC10 pembesaran 20 kali. Ketebalan endometrium diukur dengan <i>live-auto exported to microsoft excel</i> . Ketebalan endometrium tikus diukur mulai lapisan berbatasan langsung dengan lumen uterus sampai batas antara lapisan endometrium dengan lapisan miometrium (Suardi, 2016).	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

1. Pembagian kelompok

Jumlah tikus betina sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok dan setiap kelompok berisi tikus 6 ekor:

- a. Kelompok 1/ K (-) merupakan kontrol negatif yang tidak dipapar asap rokok dan tidak diberikan ekstrak Bit merah.
- b. Kelompok 2/ K (+) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari (pagi 1 batang & sore 1 batang) dan tidak diberi ekstrak Bit merah.
- c. Kelompok 3 (PI) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari (pagi 1 batang & sore 1 batang) dan ekstrak Bit merah peroral 125 mg/KgBB/hari selama 8 minggu.
- d. Kelompok 4 (PII) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari (pagi 1 batang & sore 1 batang) dan ekstrak Bit merah peroral 250 mg/KgBB/hari selama 8 minggu.
- e. Kelompok 5 (PIII) merupakan kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang/hari (pagi 1 batang, sore 1 batang) dan ekstrak Bit merah peroral 500 mg/KgBB/hari selama 8 minggu.

2. Aklimatisasi tikus

Tikus betina (*Rattus norvegicus*) dibiarkan dalam kandang selama 7 hari dengan tujuan hewan tersebut dapat beradaptasi dilaboratorium untuk menghilangkan stress akibat transportasi. Tikus dibiarkan dalam kandang tanpa diberikan perlakuan, namun tetap diberikan makan dan minum secara *ad libitum*.

3. Pemeliharaan tikus

Alat : Ember plastik sebagai kandang, kawat berjaring sebagai tutup kandang, botol kecil tempat minum. **Bahan** : Sekam sebagai alas kandang, pakan standar yang berbentuk pallet (bulat) merk Comfeed, air minum.

Cara kerja :

- a. Tikus ditempatkan pada kandang yang tampak dari luar (ember plastik berukuran 37 cm x 50 cm x 12,5 cm) yang sudah dialasi sekam dan dibersihkan atau ganti sekam setiap 2 kali per minggu dan penutup kandang yang terbuat dari kawat berjaring.
- b. Sebelum tikus digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu harus dilakukan penyediaan pakan. Pakan terbuat dari pakan standar yang berbentuk pallet (bulat) merk Comfeed dan dicampur dengan tepung, dengan perbandingan 3:1. Banyaknya pakan per hari yang disediakan adalah 40 gr/hari yang diberikan pada pagi hari serta minum yang diberikan menggunakan botol kecil sebanyak 150 ml perekor/hari, konsumsi tikus adalah *ad libitum*. Sisa pakan dari pemberian hari sebelumnya tidak digunakan kembali.
- c. Menciptakan suasana lingkungan yang stabil dengan ventilasi yang cukup dan suhu ruangan yang baik sesuai dengan kebutuhan fisiologis tikus antara 27°C -28°C.

4.7.2 Pemaparan asap rokok pada tikus betina (*Rattus norvegicus*)

Alat: Timbangan berat badan neraca *ohaus*, Spuit 20cc, *smoking pump* (terbuat dari fiber glass berukuran 26 x 12 x 12 cm³. **Bahan** : Rokok kretek Trubus Tulung Agung.

Cara Kerja:

Sebelum tikus dipapar asap rokok, berat badan tikus ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca *ohaus* kemudian asap rokok Trubus Tulung

Agung dipaparkan menggunakan *smoking pump* sebanyak 2 batang perhari (waktu paparan masing-masing rokok \pm 4 menit) diberikan pagi hari 1 batang dan sore hari 1 batang sebelum diberikan ekstrak Bit merah selama 8 minggu di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya bahwa paparan asap rokok sebanyak 2 batang/hari yang diberikan pada pagi hari 1 batang dan pada sore hari sebanyak 1 batang selama 8 minggu terbukti dapat meningkatkan kadar MDA, menurunkan jumlah folikel primer dan menurunkan kadar estradiol pada ovarium tikus betina (Ratnawati *et al*, 2014).

4.8 Pemberian Ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*)

4.8.1 Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) dengan Pelarut Etanol 90 %

Bit merah didapatkan dari kebun pertanian Kota Batu Malang dan dilakukan proses penjemuran hingga menjadi serbuk di UPT Materia Medika yang terletak di jalan Lahor nomor 87 Kota Batu Malang Jawa Timur. Buah Bit merah yang dipilih adalah buah yang segar, tidak busuk, kemudian dilakukan pencucian hingga bersih, diiris tipis-tipis dan dijemur diluar ruangan agar terkena cahaya matahari supaya buah Bit merah yang dikeringkan bebas dari air. Bit merah yang sudah kering diblender sehingga didapatkan dalam bentuk simplisia (serbuk).

Selanjutnya serbuk Bit merah diekstraksi menggunakan larutan etanol 90% dengan metode maserasi di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Maserasi adalah proses mengekstraksi menggunakan pelarut sampai beberapa kali pengadukan dengan suhu kamar. Hasil Yang didapat dari Bit merah mentah sebanyak 15 kg menghasilkan serbuk sebanyak 900 gr. Kemudian serbuk Bit merah diambil sebanyak 500 gr untuk di ekstraksi menggunakan etanol 90% menghasilkan pasta sebanyak 55 gram. Kemudian di

lakukan ekstraksi ulang yang menghasilkan 20 gram pasta Bit merah. Untuk menentukan dosis ekstrak Bit merah pada kelompok perlakuan, maka digunakan rumus deret ukur, yaitu:

$$Y_N = Y_1 \times R^{N-1}$$

Keterangan:

Y_n = Dosis ke n

Y_1 = Kelompok ke

R = Faktor geometri (Tidak boleh 0 ataupun 1).

Dosis yang digunakan adalah :

Dosis 1 = **125 mg**

Dosis 2 = $Y_1 \times R^{N-1}$

= $125 \times 2^{2-1}$

= **250 mg**

Dosis 3 = $Y_1 \times R^{N-1}$

= $125 \times 2^{3-1}$

= **500 mg**

Bahan: Buah Bit merah kering 100 gram, larutan etanol 90 %. **Alat:** Timbangan analitik, pengaduk, gelas beker, kertas saring *whatman*, *vacum oven*, botol kaca, bejana perendam.

Cara Kerja:

Buah Bit kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian masukkan Bit merah kering kedalam gelas beker ukuran 1 L air. Tuangkan pelarut etanol dengan perbandingan 1:9 (100 gr serbuk Bit merah dan 900 ml cairan etanol 90%). Selanjutnya campuran tersebut dikocok selama 30 menit lalu biarkan selama 1 malam pada suhu ruangan sehingga mengendap dan dilakukan pengulangan

secara bergantian. Saring bahan yang telah tercampur untuk memperoleh campuran pelarut dan zat aktif dengan menggunakan kertas saring *whatman* nomor 40. Selanjutnya lakukan proses evaporasi, campuran pelarut dan ekstrak yang telah disaring sebanyak 1 L dimasukkan kedalam labu kemudian dipasang pada evaporator. Isi *water bath* hingga penuh kemudian atur suhu hingga 90°C. Pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif, yaitu aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ hingga 2 jam) ± 900 ml. Hasil ekstraksi diperoleh berupa pasta kurang lebih $\frac{1}{5}$ dari bahan kering, dan dimasukkan kedalam botol serta simpan dalam freezer.

4.8.2 Pengenceran Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*)

Ekstrak Bit merah dalam bentuk pasta terlebih dahulu diencerkan sebelum diberikan ke tikus menggunakan aquades. Pengenceran sebanyak 1 gr ke dalam 100 ml aquades yang menghasilkan suspensi dengan konsentrasi 10 mg/ml. Jumlah suspensi yang diberikan pada tikus betina dibagi 2 dosis pemberian, karena mengingat kapasitas bisa masuk lambung tikus sebesar 5ml maka dosis ekstrak yang diberikan pada tikus dibagi dalam 2 x pemberian yaitu 2 kali sehari yaitu pagi dan sore.

1. Kelompok perlakuan 1 (P1)

$$\frac{18.75}{10} \times 1ml = 1.875 ml$$

Di berikan pada masing-masing tikus perhari sebanyak 18.75 ml. dibagi 2 dosis untuk 2 kali pemberian perhari yaitu: pagi 0.94 ml dan sore 0.94 ml.

2. Kelompok perlakuan 2 (P2)

$$\frac{37.5}{10} \times 1ml = 3.75ml$$

Di berikan pada masing-masing tikus perhari sebanyak 37.5 ml. dibagi 2 dosis untuk 2 kali pemberian perhari yaitu: pagi 1.875 ml dan sore 1.875 ml.

3. Kelompok perlakuan 3 (P3)

$$\frac{75}{10} \times 1ml = 7.5ml$$

Di berikan pada masing-masing tikus perhari sebanyak 7.5 ml. dibagi 2 dosis untuk 2 kali pemberian perhari yaitu: pagi 3.75ml dan sore 3.75 ml. Mengingat kapasitas cairan yang dapat masuk lambung tikus sebesar 5ml maka dosis ekstrak yang diberikan pada tikus dibagi dalam 2 x pemberian. Tikus betina diberi ekstrak 2 kali sehari pagi dan sore.

4.9 Pewarnaan Preparat Apusan Vagina (Swab vagina)

Sebelum tikus dianastesi maka terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan apusan vagina untuk mengetahui fase proestrus pada siklus estrus tikus. Pemeriksaan Swab vagina tikus dilakukan pada hari ke-57 setelah paparan. Sampel diperoleh dengan mengambil jaringan epitel vagina tikus.

Bahan : Giemsa, alkohol, NaCL 0,9%. **Alat:** *Cotton bud* (kapas lidi), objek glass, mikroskop.

Cara kerja:

1. *Cotton bud* yang sudah dicelupkan kedalam larutan NaCL 0,9% diambil kemudian masukkan ke dalam vagina tikus dengan sudut 45° dan melakukan apus sebanyak 1 - 2 kali putaran.
2. Hasil apusan dari cotton bud dioleskan pada objek glass dan dikeringkan, selanjutnya dilakukan pewarnaan pada preparat apusan vagina. Setiap pengambilan sampel apusan vagina dibuat sebanyak 2 preparat apusan untuk 1 tikus (Prayogha, 2012).
3. Preparat apusan yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam larutan alkohol absolut untuk difiksasi selama 3 menit kemudian diangkat, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.

4. Preparat ditetesi larutan giemsa selama 15 menit, kemudian diangkat dan bilas dengan air mengalir, lalu keringkan, anginkan dan diamati morfologi sel epitel di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x dan 400x kemudian dicatat (Prayogha, 2012).

4.10 Prosedur Pengambilan Organ Endometrium

Pembedahan hewan coba dilakukan pada hari ke-57 setelah perlakuan dan sudah dinyatakan tikus tersebut pada fase proestrus. **Bahan:** injeksi Ketamin 1%, formalin 10%, NaCl 0,9%, kertas saring. **Alat :** Pinset, gunting, botol tertutup tempat organ, spuit 1 cc, papan sebagai alas tempat pembedahan, paku payung.

Cara kerja :

1. Alat dan bahan untuk bedah minor disiapkan
2. Tikus dianastesi dengan dengan injeksi ketamin 1 % sebanyak 0,2 ml secara *intra Peritoneal* (IP) dan ditunggu beberapa menit sampai tikus tidak beregerak lagi.
3. Tikus diletakkan di atas alas papan dengan perut menghadap ke atas dan menggunakan paku payung untuk ditancapkan pada ke empat telapak kaki.
4. Dinding perut dibuka dengan menggunakan pinset dan dan gunting secara hati-hati, lakukan sayatan pada garis tengah kemudian ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah kemudian membuka diafragma. Kulit yang menutupi bagian dada dibuka dengan insisi dari px (*prosesus xypoides*) ke arah leher dan ditarik ke samping.
5. Uterus diambil dengan hati-hati dengan memotong jaringan-jaringan yang mengikatnya.
6. Uterus dibersihkan dari seluruh ligamen yang melekat. Selanjutnya uterus dibersihkan dari darah dengan menggunakan (NaCl 0,9%), organ ditiriskan dengan menggunakan kertas saring dengan satu kali tekanan.

7. Setelah air pada organ mulai mengering, uterus utuh ditimbang dengan grade analitik (timbangan digital Ohaus) dan selanjutnya dipisahkan antara tandur uterus kiri dan kanan.
8. Kemudian uterus bagian kanan dimasukkan kedalam botol yang berisi larutan *Fixative buffer* formalin 10% dan direndam selama 12-24 jam.
9. Organ siap dikirim untuk diproses menjadi preparat di laboratorium patologi anatomi untuk pemeriksaan ketebalan endometrium dan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen α
10. Bangkai tikus tersisa yang tidak digunakan lagi dikubur sedalam 0,5 m dengan aman sehingga tidak terjadi pencemaran lingkungan.

4.11 Pembuatan sediaan Histopatologi

Bahan : Jaringan uterus, *buffer* formalin 10%, *xylol*, alkohol, amonia, cat *Hematosiklin Eosin*. **Alat :** Kaset, mesin *Tissue Tex Prosesor*, stop watch, *microtome*, oven.

Cara kerja :

1. Proses pemotongan jaringan berupa *makross*
 - a. Jaringan uterus difiksasi dengan larutan *buffer* formalin 10%
 - b. Jaringan uterus dipilih yang terbaik, sesuai dengan yang akan diteliti.
 - c. Jaringan uterus dipotong dengan ketebalan 2-3 mm
 - d. Jaringan uterus dimasukkan dalam kaset dan diberi kode sesuai dengan gross peneliti.
 - e. Jaringan uterus dimasukkan dalam larutan formalin 10% sebelum diproses/dimasukkan dengan alat otomatis *Tissue Tex Prosesor*.
 - f. Lakukan proses menggunakan mesin otomatis *Tissue Tex Prosesor* selama 90 menit
 - g. Alarm berbunyi tanda selesai.
2. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

- a. Jaringan uterus diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*
- b. Jaringan uterus diblok dengan parafin sesuai dengan kode jaringan
- c. Jaringan uterus dipotong dengan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikro meter.

3. Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di letakkan dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80°C, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit. Selanjutnya di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

4. Proses Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Cat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama 15 menit, celupkan 2-3 kali kedalam alkohol asam 1%, lalu celupkan kedalam amonia lithium karbonat 3-5 kali (jika kurang biru). Cat pembanding Eosin 1% selama 10-15 menit.

5. Dehidrasi

Rendam secara berurutan dalam alkohol 70 % selama 3 menit, alkohol 80 % selama 3 menit, alkohol 96 % selama 3 menit, alkohol absolut selama 3 menit.

6. *Clearing* (Penjernihan)

Xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali.

7. Mounting dengan Entelan dan deckglass

Slide / objek glass ditutup dengan cover glass dan biarkan slide kering pada suhu ruangan Setelah slide kering siap untuk diamati.

4.12 Pengamatan Histopatologi

1. Pemeriksaan ekspresi reseptor Estrogen α dengan metode *Immunohistokimia* (IHC)

Bahan : *Buffer sitrat*, aquades, H_2O_2 , metanol, PBS, slide, *mayer*, antibodi primer RE- α , immunotasting kit. **Alat :** Mikropipet, tip, tabung *eppendorf*, tabung reaksi, aluminium foil, *waterbath*, *chamber*, *cover glass*, mikroskop.

Cara Kerja :

a. *Antigen Retrieval* dengan *Buffer Sitrat*

Buffer sitrat dan aquades disiapkan sampai batas 50 ml dalam *chamber*. Slide direndam dalam *chamber* dan dimasukkan ke dalam *waterbath* dengan suhu $95^{\circ}C$ selama 20 menit. Slide dikeluarkan dari *waterbath*, ditunggu dalam suhu ruang sampai 20 menit, kemudian bilas dengan aquades dan dicuci dengan PBS (3 x 5 menit).

b. *Immunohistokimia* (IHC)

1) Hari Pertama

a) *Slide* siap dicuci

Untuk bloking enzim endogen, ditambahkan H_2O_2 yang telah dilarutkan dalam metanol, lalu diinkubasi dalam *staining chamber* selama 20 menit. Dalam proses ini menggunakan pelarut metanol sehingga mudah menguap dan jaringan juga mudah kering. Oleh karena itu perlu dijaga agar jaringan tidak kering selama inkubasi dengan menambahkan larutan kembali setelah 10 menit kemudian. Setelah diinkubasi 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit, dan diusap sekeliling jaringan dengan tissue (jangan menyentuh jaringan).

b) *Blocking Unspesifik Protein*

Untuk *Blocking unspesifik* protein digunakan *sniper* (dari kit) yaitu ditambahkan 0,25 % Triton 100 dalam *buffer* PBS + FBS selama 60 menit pada suhu ruang pada *slide*, kemudian

diinkubasi dalam *staining chamber* selama 15 menit pada suhu ruang. Penambahan *sniper* ini sebagai opsonin yang bertujuan agar mempermudah penetrasi antibodi ke dalam jaringan. Kemudian dicuci PBS steril 3x5 menit dan diusap sekeliling jaringan dengan tissue (jangan menyentuh jaringan).

c) Inkubasi antibodi primer

Antibodi primer yang telah dilarutkan dalam PBS 5% + FBS 5% ditambahkan. Antibodi yang digunakan adalah antibodi reseptor estrogen α tikus betina putih. Kemudian diinkubasi dalam *staining chamber* pada suhu 4°C *overnight*.

2) Hari kedua

Hari ke-2 *slide* dikeluarkan dari suhu 4°C lalu ditunggu dengan suhu ruangan, kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit dan diusap sekeliling jaringan dengan tissue (jangan menyentuh jaringan).

a) Inkubasi antibodi sekunder dan *Streptavidin Horseradish Peroxidase* (SAHRP)

Antibodi sekunder yang digunakan berasal dari kit ditambahkan, kemudian diinkubasi dalam *staining chamber* selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit dan diusap sekeliling jaringan dengan tissue (jangan menyentuh jaringan).

b) Aplikasi *Chormagen Diaminobenzidine* (DAB)

DAB dari kit (DAB *Chromagen*: DAB *buffer* = 1:40) ditambahkan, kemudian diinkubasi dalam *staining chamber* selama 10-20 menit pada suhu ruangan. Pada hasilnya

maka akan terekspresi dengan warna coklat. Kemudian dicuci dengan aquades 3x5 menit dan diusap sekeliling jaringan dengan tissue (jangan menyentuh jaringan)

c) *Counterstain* dengan *Mayer's-Hematoxilen*

Mayer 40 μ l ditambahkan pada setiap *slide*, lalu teteskan aquades \pm 2 tetes, *slide* yang masih terendam dalam *mayer* diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x, jika sudah terlihat sitoplasma berwarna coklat, segera bilas dengan aquades selama 5 menit. Mayer ini bertujuan untuk mewarnai bagian yang tidak berwarna. Hasilnya akan terekspresi warna ungu.

d) *Mounting* dengan entelan

Slide dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, lalu *slide* ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil dapat dilihat esok harinya, diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan untuk menghitung persentasenya menggunakan foto *Dot slide OLYMPUS XC 10* dan perhitungan dilakukan secara manual menggunakan *cell count*.

Langkah perhitungan ekspresi reseptor estrogen α menggunakan aplikasi *cell count*.

- 1) Sebelum perhitungan dilakukan secara manual, preparat yang sudah diwarnai dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC) terlebih dahulu dikonsultasikan kepada dokter ahli Patologi Anatomi (PA). Hasil konsulan bahwa pewarnaan preparat sudah benar dan bisa dihitung.

- 2) Kemudian preparat yang sudah diwarnai difoto dengan menggunakan *Dot slide* mikroskop *OLYMPUS XC10* dengan pembesaran 400x dan 10 lapang pandang dari lumen epitel sampai lapisan basalis. Data ekspresi diperoleh dari jumlah inti sel yang menunjukkan positif yakni berwarna coklat.
- 3) Hasil foto dimasukkan dalam aplikasi *cell count*, diklik pada setiap sel yang terekspresi sehingga keluar hasil berupa angka absolut dari jumlah sel yang terekspresi reseptor estrogen α perlapang pandang. Kemudian dijumlahkan dan dihitung reratanya sehingga menghasilkan 1 data untuk 1 kelompok perlakuan. Untuk perhitungan sel dilakukan oleh peneliti.

2. Pengukuran Ketebalan Endometrium

Bahan: Preparat histologi endometrium. **Alat:** *Microscop olympus XC 10*

Cara kerja :

a. Deparafinisasi

Memasukkan objek gelas (slide) yang sudah melalui proses persiapan preparat histopatologi dalam larutan xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

b. Hidrasi

Memasukkan slide kedalam etanol mulai dari etanol absolut selama 4 menit, 96 % selama 3 menit, dan etanol 80 % selama 2 menit. Slide kemudian dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit.

c. Pengecatan dengan cat utama

Pemberian cat utama *mayer's Hematoksilin* selama 5 menit dan dilanjutkan dengan *Harris's Hematoksilin* selama 2 menit.

d. Pengecatan dengan cat pembanding

Pemberian cat pembanding Eosin 1% selama 3-5 menit.

e. Rehidrasi

Memasukkan slide kedalam etanol mulai dari ethanol 70% selama 2 menit, ethanol 90% selama 3 menit, ethanol 96% selama 4 menit dan etanol absolut selama 5 menit.

f. *Clearing*

Slide dimasukkan kedalam larutan xylol ulang sampai 3 kali masing-masing selama 5 menit.

g. Mounting

Slide ditetesi entelan lalu ditutupi cover glass

Langkah Pengukuran Ketebalan Endometrium dengan kamera Dot Slide Olympus XC10 dengan pembesaran 400 kali, yakni:

Sebelum dilakukan pengukuran ketebalan endometrium terlebih dahulu preparat histologi endometrium dikonsultasikan kepada dokter ahli Patologi Anatomi (PA) untuk pembacaan hasil preparat batas pengukuran ketebalan endometrium dari lumen epitel sampai lapisan basalis endometrium. Sediaan jaringan endometrium dipotong transversal dan diwarnai dengan pewarnaan HE (Hemotoksilin-eosin) untuk mengukur ketebalan endometrium.

Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan pada mikroskop dengan menggunakan dot slide mikroskop Olympus XC10 terhadap 25 preparat histologis endometrium dengan pembesaran 20x. Teknik pengukuran data dilakukan pada 10 titik yaitu 5 titik tebal endometrium tertinggi dan 5 titik endometrium terendah, dihitung secara *live-auto exported to microsoft excel*. Kemudian hasil perhitungan dijumlahkan dan dihitung rerata sehingga menghasilkan 1 data untuk 1 kelompok perlakuan dan satuan ketebalan endometrium yaitu μm .

4.13 Teknik Analisa Data

Penelitian ini menggunakan teknik analisis data secara berurutan antara lain: (1) uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk data yang berskala rasio dan ukuran sampel kecil, (2) uji *Anova One Way* (uji F) untuk membandingkan lebih dari 2 kelompok sampel dan data terbukti berdistribusi normal, (3) uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) (bila pada uji *Anova One Way* diperoleh H_0 ditolak) dengan menggunakan LSD (*Least Significant Different*), (4) uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal, dan tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows 23*. Secara lengkap dijelaskan di bawah ini.

1. Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik, hal ini dikarenakan semua data yang terukur menunjukkan skala data rasio. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan. Sedangkan jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santoso, 2005).

2. Uji *One Way Anova*

Pengujian dengan *Anova One Way* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur pada lebih dari 2 kelompok sampel. Uji ini digunakan bila data berdistribusi normal, bila tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh perlakuan dari peneliti terhadap objek sampel penelitian. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) (Steel dan Torrie, 1995). Tujuan digunakan uji *LSD* adalah untuk menemukan pada dosis berapa yang mempunyai pengaruh yang paling bermakna.

3. Uji Korelasi

Uji korelasi tidak lain adalah menguji ada atau tidak adanya tingkat keeratan hubungan dua variabel terukur (minimal berskala interval), yaitu korelasi antar variabel respon. Dalam penelitian ini digunakan uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika *p-value* > 0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang tidak bermakna antar dua variabel, dan jika *p-value* < 0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel.

Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/KK) dapat diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut:

KK = 0, tidak ada korelasi.

$0 < KK \leq 0.20$, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti.

$0.20 < KK \leq 0.40$, korelasi rendah/lemah tapi pasti.

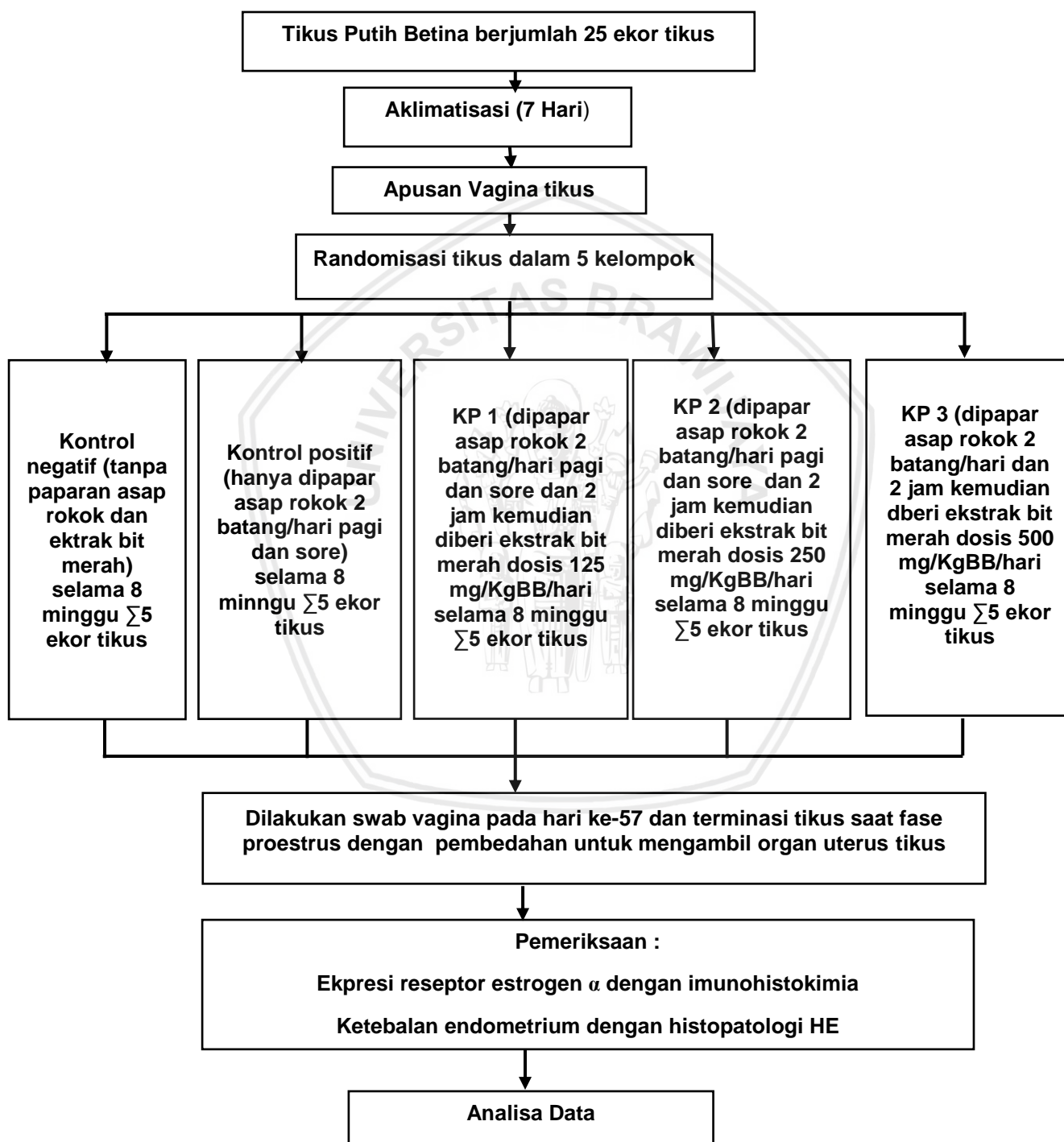
$0.40 < KK \leq 0.70$, korelasi yang cukup berarti.

$0.70 < KK \leq 0.90$, korelasi yang tinggi; kuat.

$0.90 < KK < 1.00$, korelasi sangat tinggi; kuat sekali, dapat diandalkan.

$KK = 1$, korelasi sempurna.

4.14 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Karakteristik Subjek Penelitian

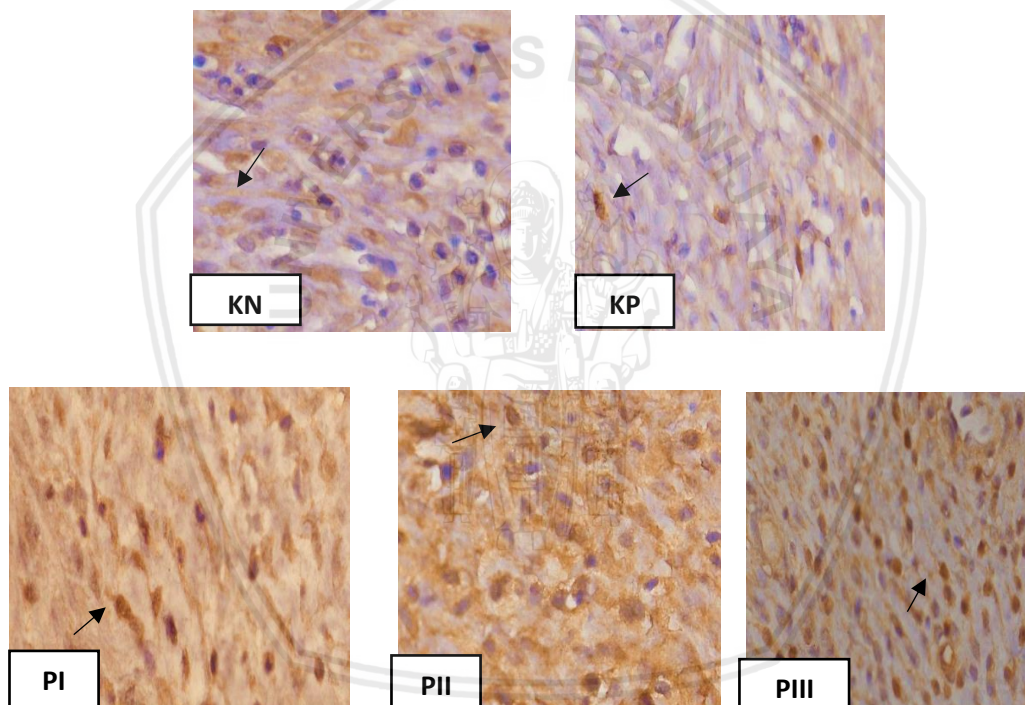
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dimulai Februari sampai Maret 2018 selama 8 minggu (56 hari). Sampel yang digunakan hewan coba tikus betina *Rattus norvegicus strain wistar* sebanyak 30 ekor sesuai kriteria eksklusi dan inklusi. Dalam perjalanan proses penelitian dilakukan terdapat 1 ekor tikus mati dari kelompok perlakuan 2 dan 1 ekor tikus mengalami infeksi di endometrium dari kelompok kontrol positif sehingga jumlah hewan coba tersisa 28 ekor. Sampel yang digunakan sebagai hasil penelitian sebanyak 25 ekor tikus betina *rattus norvegicus*.

Pada saat perlakuan tikus tampak sehat tidak terdapat kelainan, tikus menghabiskan pakan yang diberikan setiap hari 40 gr serta berat badan tikus rata-rata 120-200 gram. Pada hari ke 57 tikus dibedah untuk diambil organ uterus dengan cara swab vagina tikus terlebih dahulu untuk menentukan fase proestrus. Tikus yang dibedah hanya tikus fase proestrus, dan tikus yang belum fase proestrus tetap diberi perlakuan sampai mencapai fase proestrus. Hal ini karena siklus estrus setiap ekor tikus tidak sama, dan pembedahan tikus dilakukan pada fase proestrus.

Organ uterus yang sudah diambil ditimbang menggunakan timbangan digital ohaus, kemudian dimasukkan kedalam botol tertutup yang sudah berisi larutan formalin 10 % setelah itu dilakukan pembuatan slide di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Ekspresi reseptor estrogen α menggunakan metode *Immunohistokimia* (IHK) dan pemeriksaan ketebalan endometrium dengan pengecatan *Hematoxilin Eosin* (HE).

5.1.1 Hasil Pengamatan Ekspresi Reseptor Estrogen α pada tikus Betina yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit merah

Hasil pengamatan ekspresi reseptor estrogen α dengan imunohistokimia pada tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit merah diamati melalui foto yang telah di scan dengan mikroskop Olympus XC 10 dengan pembesaran 400x perlapang pandang pada 10 lapang pandang kemudian dihitung secara manual dengan menggunakan *cell count* pada sel-sel yang terekspresi reseptor estrogen α yang berwarna coklat di inti sel. Berikut gambar sel tang terekpresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus betina putih:

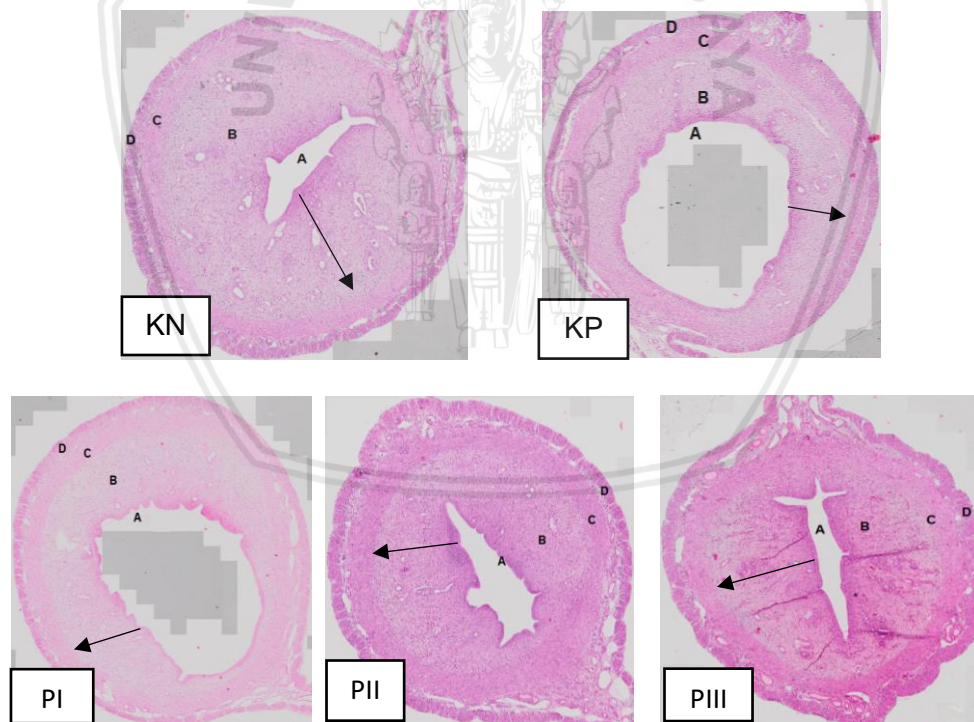


Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Ekspresi Reseptor Estrogen α pada Endometrium tikus betina yang dipapar asap rokok dan ekstrak Bit merah.

Keterangan: Pemeriksaan reseptor estrogen α dengan metode Immunohistokimia (IHK), hasil foto diamati pada mikroskop Olympus XC10 pembesaran 400x perlapang pandang dengan 10 lapang pandang yang dihitung manual dengan menggunakan *cell count*. Tanda panah menunjukkan inti sel yang terekspresikan reseptor estrogen α .

5.1.2 Hasil Pengamatan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit merah

Hasil pengamatan ketebalan endometrium dengan pewarnaan *Haemotoxilin Eosin* pada tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit merah pada sayatan transversal dilihat menggunakan mikroskop Olympus XC 10 dengan pembesaran 20x lapang pandang. Kemudian di ukur ketebalan menggunakan *live-auto exported to microsoft excel*. Pengukuran ketebalan endometrium diukur pada 10 titik, yaitu 5 titik ketebalan tertinggi dan 5 titik ketebalan terendah. Menurut Suardi (2016) Lapisan endometrium diukur mulai lapisan berbatasan langsung dengan lumen uterus tikus betina sampai batas antara lapisan endometrium dengan lapisan miometrium. Berikut gambar ketebalan endometrium Tikus Betina Putih:



Gambar 5.2 Hasil Pengamatan Ketebalan Endometrium yang Dipapar Asap Rokok dan Ekstrak Bit Merah.

Keterangan: A. Lumen, B. Endometrium, C. Miometrium, D. Perimetrium

Pemeriksaan ketebalan endometrium pada sayatan transversal dengan metode *Haemotoxilin Eosin* (HE), hasil foto dot slide pada mikroskop Olympus XC10 dengan pembesaran 20x lapang pandang diukur dengan *live-auto exported to microsoft excel* (μm). Tanda panah menunjukkan batasan pengukuran endometrium.

5.2 Uji Prasyarat Parametrik

5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Hasil Endometrium pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit Merah

Pada penelitian ini variabel ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium berskala data rasio, sehingga untuk membuktikan hipotesis penelitian dipilih pendekatan analisis statistik parametrik. Sebelum data dianalisis lebih lanjut untuk membuktikan hipotesis, maka dilakukan analisis prasyarat parametrik terlebih dahulu, yaitu data berdistribusi normal jika tidak maka digunakan analisis statistik non parametrik. Dalam penelitian uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Adapun kriteria keputusan, yaitu bila *p-value* lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ maka data berdistribusi normal dan sebaliknya bila *p-value* lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ maka data tidak berdistribusi normal. Pada analisis uji *Shapiro-Wilk* diperoleh tampak pada tabel di bawah dibawah ini.

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit Merah

Kelompok pengamatan	<i>p-value</i>		Distribusi
	Ekspresi reseptor estrogen α	Ketebalan endometrium	
kontrol negatif	0.242	0.305	Normal
kontrol positif	0.209	0.898	Normal
PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari)	0.084	0.480	Normal
PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari)	0.424	0.145	Normal
PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari)	0.757	0.988	Normal

Keterangan: Jika *p-value* < 0.05 berarti data tidak berdistribusi normal dan jika *p-value* > 0.05 berarti data berdistribusi normal.

Pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa data ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai *p-value* yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi semua data

telah terbukti berdistribusi normal sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya data dianalisis dengan uji homogenitas data.

Tabel 5.2 Hasil uji homogenitas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit Merah

Variabel	<i>p-value</i>	Keterangan
Ekspresi Reseptor estrogen α	0.121	Data homogen
ketebalan endometrium (μm)	0.308	Data homogen

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data heterogen dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data homogen.

Pada Tabel 5.2 berdasarkan hasil uji *Levene Statistic* menunjukkan bahwa data ekspresi reseptor estrogen α ($p=0.121$) dan ketebalan endometrium ($p=0.308$) telah menunjukkan nilai $p\text{-value}$ yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi data kedua variabel telah terbukti homogen sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya data dianalisis dengan uji statistika parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah tersebut pada bab 3 sebelumnya.

5.3 Hasil Uji Perbandingan antar Kelompok Kontrol

5.3.1 Hasil Uji t Sampel Bebas Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium antar Kelompok Kontrol negatif dan Kontrol Positif

Untuk membuktikan pengaruh perlakuan paparan asap rokok pada tikus betina *Rattus norvergicus* terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium, dilakukan analisis komparasi antara kelompok tikus betina yang tanpa dipapar asap rokok (kontrol negatif) dengan kelompok tikus betina yang dipapar asap rokok (kontrol positif). Pada hasil uji komparasi antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif terhadap data ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium dengan menggunakan uji t sampel bebas (*independent sample t test*) ditunjukkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.3 Hasil Perbandingan dengan Uji t antar Kelompok Kontrol negatif dan Kontrol Positif

Variabel	Kontrol negatif	Kontrol positif	<i>p-value</i>
	Rerata \pm SD	Rerata \pm SD	
ekspresi reseptor estrogen α	161.4 \pm 30.9	17.7 \pm 5.1	0.000 < α
ketebalan endometrium (μ m)	557.3 \pm 55.8	285.3 \pm 42.6	0.000 < α

Keterangan: Jika *p-value* < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika *p-value* > 0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada Tabel 5.3 berdasarkan hasil uji t sampel menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata ekspresi reseptor estrogen α antara kelompok kontrol negatif (tikus betina sehat tanpa paparan asap rokok) (161.4 \pm 30.9) dengan kelompok kontrol positif (tikus betina yang dipapar asap rokok) (17.7 \pm 5.1). Tampak nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok kontrol positif jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok akan menunjukkan ekspresi reseptor estrogen α yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus betina yang sehat. Jadi dapat dikatakan bahwa paparan asap rokok dapat berakibat terhadap penurunan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus*.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* antara kelompok kontrol negatif (tikus betina sehat tanpa paparan asap rokok) (557.3 \pm 55.8) dengan kelompok kontrol positif (tikus betina dengan paparan asap rokok) (285.3 \pm 42.6). Berdasarkan nilai reratanya ketebalan endometrium tampak pada kelompok kontrol negatif jauh lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan nilai rerata ketebalan endometrium pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus betina yang terpapar asap rokok akan menunjukkan ketebalan endometrium yang menipis bila dibandingkan dengan tikus betina yang sehat. Jadi dapat dikatakan

bahwa paparan asap rokok dapat berakibat terhadap penurunan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus*.

Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan paparan asap rokok terbukti menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus*. Jadi perlakuan pertama yaitu paparan asap rokok yang diberikan pada tikus betina *Rattus norvegicus* terbukti berpengaruh terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium.

5.4 Hasil Uji perbandingan antar kelompok perlakuan

5.4.1 Hasil Uji *One Way Anova* dan Uji *LSD* Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit merah

Perbandingan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelima kelompok sampel pengamatan dengan menggunakan uji *Anova one way* diperoleh ada perbedaan yang bermakna. Hal ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value} = 0.000 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) diperoleh secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.4 Hasil Uji *LSD* Perbandingan antar Kelompok Kontrol dan Perlakuan ekspresi reseptor estrogen α Pada Tikus Betina yang Dipapar Asap Rokok dan Ekstrak Bit merah

Kelompok pengamatan	Rerata \pm SD	<i>p-value</i>
kontrol negatif	161.4 \pm 30.9 ^c	0.000< α
kontrol positif	17.7 \pm 5.1 ^a	
PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari)	38.2 \pm 10.9 ^a	
PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari)	40.2 \pm 16.2 ^a	
PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari)	71.1 \pm 15.3 ^b	

Keterangan: Pada rerata \pm sd menunjukkan hasil uji *LSD* jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0.05$).

Pada Tabel 5.4 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi reseptor estrogen α antara kelompok negatif (161.4 ± 30.9^c) dengan kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (17.7 ± 5.1^a). Tampak nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α kelompok kontrol positif jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menurunkan ekspresi reseptor estrogen α . Demikian pula kelompok kontrol negatif (161.4 ± 30.9^c) berbeda bermakna dengan kelompok PI (38.2 ± 10.9^a), dengan kelompok PII (40.2 ± 16.2^a), dan juga dengan kelompok PIII (71.1 ± 15.3^b). Tampak nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok kontrol negatif menunjukkan nilai jauh lebih besar dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α dengan kelompok yang lain.

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi reseptor estrogen α antara kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (17.7 ± 5.1^a) dengan kelompok PI atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dosis 125 mg/KgBB/hari (38.2 ± 10.9^b). Tampak nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok PI. Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 125 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Dengan kata lain pemberian ekstrak Bit merah 125 mg/KgBB/hari akan berakibat terhadap peningkatan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Demikian pula antara kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (17.7 ± 5.1^a) dengan kelompok PII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dosis 250 mg/KgBB/hari

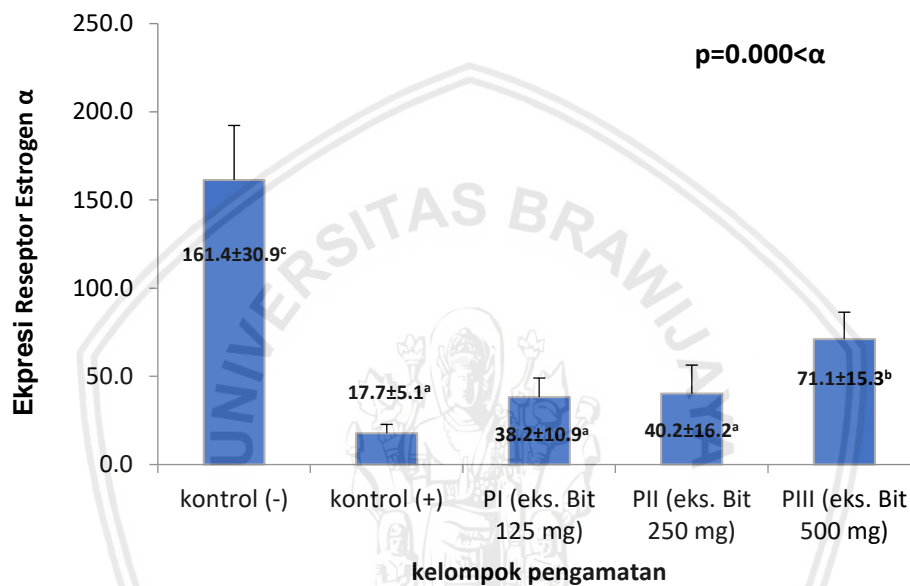
(40.2 ± 16.2^b) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi reseptor estrogen α . Pada nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α kelompok kontrol positif menunjukkan nilai yang lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok PII. Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 250 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak Bit merah 250 mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Hasil di Tabel 5.4 menunjukkan pula bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi reseptor estrogen α antara kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (17.7 ± 5.1^a) dengan kelompok PIII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dosis 500 mg/KgBB/hari (71.1 ± 15.3^c). Nilai rerata ekspresi reseptor estrogen α kelompok kontrol positif jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok PIII. Hal ini dapat diartikan bahwa tikus betina dengan perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 500 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Dengan kata lain perlakuan pemberian ekstrak etanol Bit merah 500 mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Pada penjelasan hasil dari Tabel 5.4 di atas maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian ekstrak Bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari, dosis 250 mg/KgBB/hari, dan dosis 500 mg/KgBB/hari pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan ekspresi reseptor estrogen α . Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu ekstrak Bit Merah (*Beta*

vulgaris L) dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Selanjutnya rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Gambar 5.3 Histogram rerata ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit Merah.

Pada Gambar 5.3 menunjukkan histogram rerata ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang tidak diberi apapun (kontrol negatif), tikus betina *Rattus norvegicus* dipapar dengan asap rokok (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok dan pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris* L) dengan dosis 125 mg/KgBB/hari, dosis 250 mg/KgBB/hari, dan dosis 500 mg/KgBB/hari. Tampak pada gambar tersebut batang rerata ekspresi reseptor estrogen α tertinggi pada kelompok kontrol negatif dan yang terendah pada batang rerata ekspresi reseptor estrogen α pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa paparan asap rokok pada tikus

betina mengakibatkan ekspresi reseptor estrogen α meningkat. Sedangkan rerata ekspresi reseptor estrogen α tampak meningkat pada kelompok PI, PII, dan PIII bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Peningkatan ekspresi reseptor estrogen α seiring dengan peningkatan dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang diberikan. Jadi pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok. Sedangkan dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang dianggap paling tinggi ekspresi reseptor estrogen α adalah dosis 500 mg/KgBB/hari.

Berdasarkan hasil uji *Anova oneway* pada data ketebalan endometrium diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata ketebalan endometrium kelima kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value} = 0.000 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) ditampilkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.5 Hasil Uji LSD Perbandingan antar Kelompok Kontrol dan Perlakuan Ketebalan Endometrium pada Tikus Betina yang dipapar Asap Rokok dan diberi Ekstrak Bit merah

Kelompok pengamatan	Rerata \pm SD	$p\text{-value}$
Kontrol negatif	557.3 \pm 55.8(μm) ^d	0.000< α
kontrol positif	285.3 \pm 42.6(μm) ^a	
PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari)	357.8 \pm 30.4(μm) ^b	
PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari)	457.9 \pm 35.6(μm) ^c	
PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari)	486.3 \pm 34.2(μm) ^c	

Keterangan: Pada rerata \pm sd menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0.05$).

Pada Tabel 5.5 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ketebalan endometrium antara kelompok kontrol negatif (557.3 \pm 55.8^d) dengan kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (285.3 \pm 42.6^a). Tampak nilai rerata ketebalan endometrium kelompok

kontrol positif jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ketebalan endometrium pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menurunkan ketebalan endometrium. Demikian pula kelompok kontrol negatif (557.3 ± 55.8^d) berbeda bermakna dengan kelompok PI (357.8 ± 30.4^b), dengan kelompok PII (457.9 ± 35.6^c), dan juga dengan kelompok PIII (486.3 ± 34.2^c). Tampak nilai rerata ketebalan endometrium pada kelompok kontrol negatif menunjukkan nilai jauh lebih besar dibandingkan dengan rerata ketebalan endometrium dengan kelompok yang lain.

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ketebalan endometrium antara kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (285.3 ± 42.6^a) dengan kelompok PI atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris* L) dosis 125 mg/KgBB/hari (357.8 ± 30.4^b). Tampak nilai rerata ketebalan endometrium kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ketebalan endometrium pada kelompok PI. Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 125 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ketebalan endometrium bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Dengan kata lain pemberian ekstrak Bit merah 125 mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

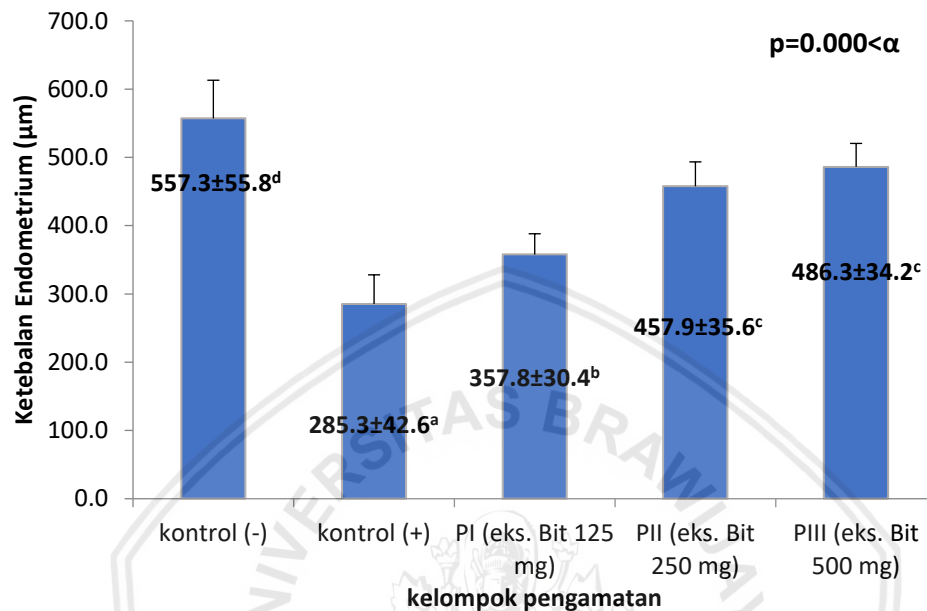
Hasil analisis LSD pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ketebalan endometrium antara kelompok kontrol positif (285.3 ± 42.6^a) dengan kelompok PII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris* L) dosis 250 mg/KgBB/hari (457.9 ± 35.6^c). Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 250 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ketebalan endometrium bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Jadi pemberian ekstrak Bit merah

250 mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Masih hasil di Tabel 5.5 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ketebalan endometrium antara kelompok kontrol positif (tikus betina yang terpapar asap rokok) (285.3 ± 42.6^a) dengan kelompok PIII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dosis 500 mg/KgBB/hari (486.3 ± 34.2^c). Tampak nilai rerata ketebalan endometrium kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ketebalan endometrium pada kelompok PIII. Hal ini berarti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok + ekstrak Bit merah 500 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ketebalan endometrium bila dibandingkan dengan tikus betina yang terpapar asap rokok. Dengan kata lain pemberian ekstrak Bit merah 500 mg/KgBB/hari dapat meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Berdasarkan penjelasan hasil dari Tabel 5.5 di atas maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian ekstrak Bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari, dosis 250 mg/KgBB/hari, dan dosis 500 mg/KgBB/hari pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang telah terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan ketebalan endometrium. Jadi hipotesis kedua terbukti, yaitu ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) dapat meningkatkan ketebalan endometrium tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Selanjutnya rerata ketebalan endometrium pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Gambar 5.4 Histogram rerata Ketebalan Endometrium Pada Tikus Betina Yang Dipapar Asap Rokok dan di beri Ekstrak Bit Merah.

Pada Gambar 5.4 memperlihatkan histogram rerata ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang tidak diberi apapun (kontrol negatif), tikus betina *Rattus norvegicus* dipapar dengan asap rokok (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok dan pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan dosis 125 mg/KgBB/hari, dosis 250 mg/KgBB/hari, dan dosis 500 mg/KgBB/hari. Tampak pada gambar tersebut batang rerata ketebalan endometrium tertinggi pada kelompok kontrol negatif dan yang terendah pada batang rerata ketebalan endometrium pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa paparan asap rokok pada tikus betina mengakibatkan ketebalan endometrium menurun. Sedangkan rerata ketebalan endometrium tampak meningkat pada kelompok PI, PII, dan PIII bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Peningkatan ketebalan endometrium seiring dengan

peningkatan dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang diberikan. Jadi pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok. Sedangkan dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang dianggap paling tebal ketebalan endometrium adalah dosis 500 mg/KgBB/hari.

5.5 Hasil uji korelasi

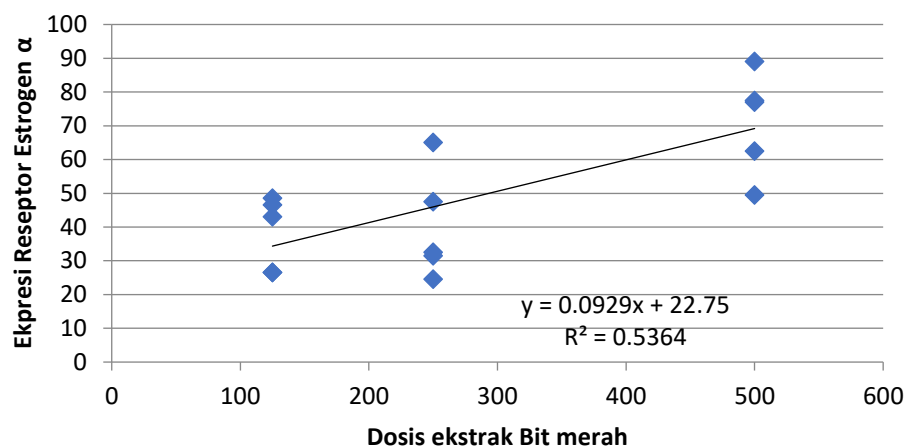
5.5.1 Hasil Uji Korelasi Peningkatan Dosis Ekstrak Bit Merah Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus yag Dipapar Asap Rokok

Uji korelasi adalah suatu uji untuk mengetahui tingkat keeratan hubungan dua variabel. Pada penelitian ini ingin diketahui tingkat keeratan hubungan antara dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*), ekspresi reseptor estrogen α , dan ketebalan endometrium. Pada data dosis ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L*) tidak menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, sehingga data dosis dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *Spearman's rho*. Adapun kriteria keputusan pada uji korelasi *Spearman's rho*, bila *p-value* < 0.05 maka ada hubungan/korelasi yang bermakna dan bila *p-value* > 0.05 maka ada hubungan/korelasi yang tidak bermakna. Adapun hasil pada uji korelasi *Spearman's rho* ditunjukkan secara ringkas pada tabel di bawah ini.

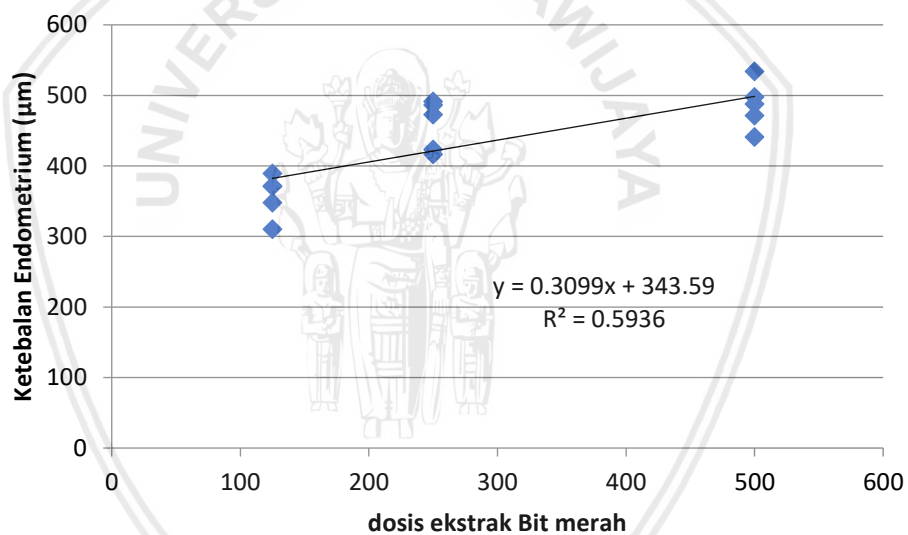
Tabel 5.6 Hasil uji korelasi Peningkatan Dosis Ekstrak Bit Merah Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus yag Dipapar Asap Rokok

Variabel yang dihubungkan	Koefisien Korelasi (r)	Arti	<i>p-value</i>
Dosis dengan ekspresi reseptor estrogen α	0.681	Cukup berarti	0.005
Dosis dengan ketebalan endometrium	0.813	Korelasi kuat	0.000
ekspresi reseptor estrogen α dengan ketebalan endometrium	0.745	Korelasi kuat	0.000

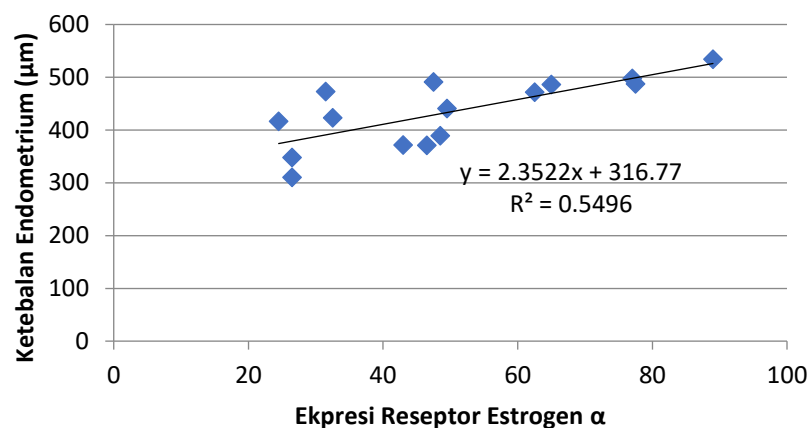
Keterangan: Pada kolom *p-value* jika *p-value*<0.05 berarti ada korelasi yang bermakna dan jika *p-value*>0.05 berarti ada korelasi yang tidak bermakna.



Gambar 5.5 Grafik Korelasi Pemberian dosis Ekstrak Bit merah terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α pada tikus betina yang dipapar asap rokok.



Gambar 5.6 Grafik Korelasi Pemberian dosis Ekstrak Bit merah terhadap Ketebalan Endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok.



Gambar 5.7 Grafik Korelasi Pemberian dosis Ekstrak Bit merah terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α dan Ketebalan Endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok.

Pada Tabel 5.6 menunjukkan bahwa ada hubungan/korelasi yang bermakna antara dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan ekspresi reseptor estrogen α ($p\text{-value}=0.005<\alpha$) pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ($n=15$) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang cukup berarti yaitu $r = 0.681$. Nilai positif pada koefisien korelasi 0.681 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila pemberian dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ditingkatkan maka akan berakibat terjadi peningkatan pula terhadap ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok. Demikian pula sebaliknya, bila dosis yang diberikan rendah maka ekspresi reseptor estrogen α akan rendah pula.

Tabel 5.6 menjelaskan pula bahwa ada hubungan/korelasi yang bermakna antara dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan ketebalan endometrium ($p\text{-value}=0.000<\alpha$) pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ($n=15$) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang sangat kuat yaitu $r = 0.813$. Nilai positif

pada koefisien korelasi 0.813 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila pemberian dosis ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ditingkatkan maka akan berakibat terjadi peningkatan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok. Demikian pula sebaliknya, bila dosis yang diberikan rendah maka ketebalan endometrium akan rendah pula atau menipis.

Berdasarkan uraian hasil Tabel 5.6 di atas maka dapat dikatakan bahwa ada hubungan antara dosis dan efek Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan peningkatan reseptor estrogen α dan peningkatan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok.

Tabel 5.6 menjelaskan pula bahwa ada hubungan/korelasi yang bermakna antara ekspresi reseptor estrogen α dengan ketebalan endometrium ($p\text{-value}=0.000<\alpha$) pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ($n=15$) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang kuat yaitu $r = 0.745$. Nilai positif pada koefisien korelasi 0.745 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila terjadi peningkatan ekspresi reseptor estrogen α maka akan berakibat terjadi pula peningkatan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* sebagai efek dari perlakuan paparan asap rokok. Demikian pula sebaliknya, bila ekspresi reseptor estrogen α turun maka ketebalan endometrium akan menurun pula pada tikus betina *Rattus norvegicus* sebagai efek dari pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) + paparan asap rokok. Jadi ada hubungan antara dosis dan efek Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan peningkatan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang. Penelitian ini menggunakan buah Bit merah yang diperoleh dari kebun pertanian organik Cangar Kota Batu, Jawa Timur. Kemudian Bit merah mulai dilakukan proses pengeringan hingga menjadi serbuk di Laboratorium Materia Medika Kota Batu Jawa Timur, sedangkan proses ekstraksi Bit merah menggunakan pelarut etanol 90%. Rokok yang digunakan adalah rokok kretek Trubus Tulung Agung diberikan melalui *smoking pump* 2 batang perhari pada pagi dan sore Tikus putih Betina (*Rattus norvegicus*) didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian dilaksanakan selama 56 hari atau 8 minggu dan dilakukan pembedahan pada hari ke 57. Sampel yang digunakan hewan coba tikus betina *Rattus norvegicus strain wistar* sebanyak 30 ekor sesuai kriteria eksklusi dan inklusi. Dalam perjalanan proses penelitian dilakukan terdapat 1 ekor tikus mati dari kelompok perlakuan 2 dan 1 ekor tikus mengalami infeksi di endometrium dari kelompok kontrol positif sehingga jumlah hewan coba tersisa 28 ekor. Sampel yang digunakan sebagai hasil penelitian sebanyak 25 ekor tikus betina *Rattus norvegicus*.

6.1 Pengaruh Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α pada Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok

Berdasarkan hasil analisa data statistik pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata ekspresi reseptor estrogen α antara kelompok kontrol negatif pada tikus betina sehat tanpa dipapar asap rokok

maupun diberi ekstrak Bit merah, dengan kelompok kontrol positif pada tikus betina hanya dipapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak Bit merah. Hal ini terbukti bahwa tikus betina dengan paparan asap rokok menunjukkan ekspresi reseptor estrogen α yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus betina yang sehat. Jadi dapat dikatakan bahwa paparan asap rokok sebanyak 2 batang/hari selama 56 hari (8 minggu) dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina *Rattus norvegicus*. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Tuttle *et al* (2009), menyebutkan bahwa *benzo(a)pyrene* dalam asap rokok mempengaruhi penurunan hormon estradiol sehingga menyebabkan menurunnya pertumbuhan sel folikel di ovarium. Penelitian yang mendukung juga dilakukan Seyedeh *et al*, (2014) bahwa pemberian nikotin pada tikus, terbukti dapat merubah histologi uterus dan saluran sel telur yang dipengaruhi oleh hormon estradiol menurun sehingga terjadi penurunan ekspresi reseptor estrogen α . Selain itu tikus yang dipapar asap rokok juga terbukti menurunkan ekspresi reseptor estrogen α di endometrium (Utami, 2016).

Asap rokok mengandung sekitar 4000 senyawa kimia memberi efek tidak baik dan mengandung toksik untuk kesehatan manusia, diantaranya *benzo(a)pyrene*, nitrosamin, kadmium, nikotin (Dechanet *et al*, 2011), tar, karbon monoksida, nikel amoniak dan sebagainya (Cunningham, 2005; Kinanti dkk, 2016). Asap rokok beresiko tinggi terserang penyakit jantung, dan kanker endometrium (Zhou *et al*, 2011). Penelitian lain menyebutkan bahwa asap rokok dapat bersifat sebagai antiestrogenik sehingga menyebabkan gangguan haid, memungkinkan terjadi anovulasi pada wanita, infertilitas serta menopause dini (Gannon *et al*, 2011). Selain itu asap rokok juga dapat mempengaruhi kesehatan reproduksi wanita yang berhubungan dengan penurunan kesuburan pada wanita (Camlin *et al*, 2014). Artinya asap rokok memicu ROS meningkat sehingga terjadi stres oksidatif. Stres

oksidatif terjadi akibat tidak seimbangnya antioksidan dan ROS, sehingga diperlukan antioksidan dari luar tubuh untuk menyeimbangkan keduanya. penelitian yang mendukung bahwa Bit merah (*Beta vulgaris L*) yang berfungsi sebagai antioksidan pada dosis 250 dan 500 mg/KgBB/hari mampu menangkal radikal bebas pada tikus dengan gangguan ginjal nefrotoksik yang di induksi gentamisin (Gamal *et al*, 2014).

Berdasarkan hasil uji *one way anova* dengan uji LSD diperoleh ada perbedaan bermakna rerata ekspresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus betina yang dipapar asap rokok pada tiap antara kelompok kontrol positif (paparan asap rokok tanpa ekstrak Bit merah), kelompok perlakuan I (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dengan dosis 125 mg/KgBB/hari), perlakuan II (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dengan dosis 250 mg/KgBB/hari) dan perlakuan III (paparan asap rokok + ekstrak Bit merah dengan dosis 500 mg/KgBB/hari). Maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian ekstrak Bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari, dosis 250 mg/KgBB/hari, dan dosis 500 mg/KgBB/hari pada tikus betina *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan ekspresi reseptor estrogen α . Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L*) dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus betina (*Rattus Norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

Estrogen disekresikan terutama oleh sel granulosa dari folikel ovarium (Ganong, 2010). Selain itu stimulasi estrogen dapat meningkatkan jumlah dan ukuran sel miometrium dan endometrium yang disertai dengan tahapan pembentukan reseptor estrogen yang spesifik dan proses sintesa protein (Mylonas *et al*, 2005). Estrogen berada didalam darah dan sebagian besar terikat dengan protein plasma dan berdifusi kedalam sel dan nukleus untuk berikatan dengan

reseptor spesifik (Greeinsten & Wood, 2006). Estrogen dapat berikatan dengan reseptornya bila menembus permukaan sel dan masuk kedalam sel (sitoplasma) kemudian berikatan dengan estrogen dalam sitoplasma dan membentuk ikatan hormon reseptor pada *estrogen responsive element* kemudian bergerak menuju inti sel untuk berikatan dengan DNA. Setelah berikatan dengan DNA maka akan terjadi proses transkripsi untuk membentuk protein-protein khusus yang dibutuhkan dalam pembelahan sel (Sperrof & Fritz, 2005).

Jika hormon estrogen tidak ada maka reseptor estrogen akan bersifat inaktif dan berada dalam inti sel target dan berikatan dengan *heat shock* protein. Hormon estrogen yang masuk kedalam sel target akan berikatan dengan reseptor estrogen yang berada di inti sel sehingga reseptor estrogen menjadi aktif (McDonnel & Norris, 2002).

Bit merupakan jenis sayuran yang mengandung pigmen bioaktif yang dikenal sebagai betalain, anggota keluarga betalain, yaitu pigmen betasianin yang berwarna merah violet dan pigmen *betaxanthin* berwarna kuning oranye. Beberapa penelitian dilaporkan bahwa senyawa aktif betalain dalam Bit merah mampu menghasilkan antioksidan dan antiinflamasi yang tinggi secara in vitro dan berbagai model hewan in vivo (Clifford *et al*, 2015).

Betalain bersifat larut air dan kaya kandungan nitrogen yang dihasilkan dari pigmen merah Bit merah. Pigmen merah yang terdapat pada Bit merah merupakan betalain. Betalain merupakan golongan antioksidan. Betasianin merupakan turunan dari betalain. Betasianin dari Bit merah terbukti memiliki efek anti radikal bebas dan antioksidan tinggi. Betasianin merupakan zat warna yang memberikan warna merah dan merupakan senyawa fenol (Gengatharan *et al*, 2015; Setiawan dkk, 2015).

Bit merah mengandung senyawa kimia diantaranya, asam askorbat, karetenoit, asam fenolik, betalain, dan favonoid. Banyak penelitian menyebutkan bahwa betalain memiliki antioksidan tinggi dan anti inflamasi pada beberapa model hewan coba. Suplemen Bit merah dapat mencegah kerusakan oksidatif pada struktur DNA, lipid, dan protein secara in vitro. Bit merah terbukti dapat mencegah hipertensi, diabetes dan peradangan dalam tubuh manusia (Clifford *et al*, 2015; Indu *et al*, 2017). Berbagai penelitian telah dilakukan, bahwa ekstrak Bit merah berfungsi sebagai antioksidan, anti kanker, antimikroba, anti malaria dan anti inflamasi (Vulic *et al*, 2013; Gengatharan *et al*, 2015).

Untuk menetralkan ROS berlebihan dalam tubuh maka dibutuhkan antioksidan. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ratnawati *et al* (2014), pemberian alfa *tocopherol* pada tikus betina yang dipapar asap rokok, terbukti dapat mencegah stres oksidatif ditandai dengan meningkatnya hormon estrogen. Selain itu pigmen antosianin dari ubi jalar ungu terbukti efektif mencegah stres oksidatif dengan meningkatnya ekspresi reseptor estrogen α di endometrium tikus betina yang dipapar asap rokok. Penulis berasumsi bahwa hal tersebut dapat mencegah terjadinya infertilitas (Utami, 2016).

Berdasarkan gambar 5.1 hasil pengamatan ekspresi reseptor estrogen α pada endometrium tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) yaitu yang mengekspresi pada intisel yang berwarna coklat menunjukkan positif. Sebelum perhitungan dilakukan terlebih dahulu dibaca hasil pada dot slide ekspresi reseptor estrogen dengan dokter spesialis patologi anatomi. Perhitungan dilakukan pada endometrium tikus betina putih diamati ekspresi reseptor estrogen α pada stroma dan sel epitel kelenjar. Penghitungan dilakukan secara manual kemudian dijumlahkan menggunakan *cell count*. Kemudian dijumlahkan dan dihitung reratanya sehingga

menghasilkan 1 data untuk 1 kelompok perlakuan. Untuk perhitungan sel yang terekspresi reseptor estrogen α dilakukan oleh peneliti.

6.2 Pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terhadap ketebalan endometrium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok

Berdasarkan hasil uji t sampel menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* antara kelompok kontrol negatif (tikus betina sehat tanpa paparan asap rokok) dengan kelompok kontrol positif (tikus betina dengan paparan asap rokok). Berdasarkan nilai reratanya ketebalan endometrium tampak pada kelompok kontrol negatif jauh lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan nilai rerata ketebalan endometrium pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus betina yang terpapar asap rokok akan menunjukkan ketebalan endometrium yang menipis bila dibandingkan dengan tikus betina yang sehat. Maka dapat dikatakan bahwa paparan asap rokok terbukti dapat berakibat terhadap penurunan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus*. Hal ini sesuai dengan penelitian Lee *et al* (2017) pada tikus betina, paparan asap rokok dapat mempengaruhi kerusakan folikel di ovarium dan menghambat pertumbuhan proliferasi sel di endometrium sehingga terjadi apoptosis.

Penelitian yang dilakukan oleh Khorram *et al* (2010), menyebutkan paparan asap rokok menyebabkan stres oksidatif pada endometrium tikus sehingga menghambat proliferasi sel melalui jalur nitrit oksid yang berakibat gangguan siklus menstruasi. Selain itu nikotin, karbonmonoksida dan *benzo(a)pyrene* juga menurunkan proliferasi sel di endometrium, yang berakibat terjadi penurunan ketebalan endometrium.

Endometrium merupakan lapisan bagian terdalam rongga uterus. Ketebalan dinding rahim dapat terjadi perubahan siklus dan terjadi pelepasan lapisan dinding

rahim pada saat menstruasi. Endometrium berperan penting dalam implantasi embrio dan sebagai tempat pertumbuhan plasenta (Rzymiski *et al*, 2014). Asap rokok mengandung zat racun berbahaya bagi kesehatan manusia, yakni beresiko terserang penyakit jantung dan kanker endometrium (Zhou *et al*, 2011) serta mempengaruhi kesehatan reproduksi yang berakibat menurunkan kesuburan wanita (Camlin *et al*, 2014), dengan kata lain dapat mengalami infertilitas pada wanita. Penurunan ketebalan endometrium dapat menghambat implantasi sehingga dapat memicu terjadinya infertilitas.

Asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat merusak DNA pada endometrium, maka dari itu diperlukan antioksidan dari luar untuk menangkal radikal bebas. Kandungan Bit merah mengandung zat kimia yang disebut betalain, yang mana senyawa tersebut tinggi antioksidan. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa ekstrak Bit merah berfungsi sebagai antioksidan, anti kanker, antimikroba, anti malaria dan anti inflamasi (Vulic *et al*, 2013; Gengatharan *et al*, 2015). Untuk menetralsir ROS berlebihan dalam tubuh maka dibutuhkan antioksidan.

Berdasarkan hasil uji *oneway anova* dengan uji LSD, pemberian ekstrak Bit merah dapat meningkatkan ketebalan endometrium pada dosis 125 mg/KgBB/hari pada tikus yang dipapar asap rokok, menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik. Begitu juga dengan pemberian ekstrak Bit merah dengan dosis 250 mg/KgBB/hari dan pemberian ekstrak Bit merah dengan dosis 500 mg/KgBB/hari menunjukkan ada perbedaan bermakna pada tikus yang dipapar asap rokok. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Ratnawati *et al* (2014), pemberian alfa *tocopherol* pada tikus betina yang dipapar asap rokok, terbukti dapat mencegah stres oksidatif ditandai dengan meningkatnya ketebalan endometrium. Begitu juga dengan penelitian Utami (2016) menyebut bahwa pigmen antosianin dari ubi jalar ungu terbukti efektif mencegah stres oksidatif dengan meningkatnya ketebalan

endometrium tikus betina yang dipapar asap rokok dan penulis berasumsi bahwa hal tersebut dapat mencegah terjadinya infertilitas.

Estrogen yang dihasilkan ovarium selama maturasi folikel akan merangsang pertumbuhan proliferasi kelenjar pada endometrium yang disebut dengan fase proliferaatif. Estrogen dapat membuat endometrium bersifat sekretorik sebagai persiapan konsepsi, menstimulasi sel epitel dan stroma endometrium berproliferasi sehingga meningkatkan ketebalan endometrium (Sperrof & fritz, 2005; Guyton & Hall, 2016). Pertumbuhan endometrium terjadi karena proliferasi sel epitel maupun elemen stroma yang dipengaruhi oleh hormon estrogen yang disekresi ovarium (Mylones *et al*, 2005).

Berdasarkan gambar 5.2 hasil pengamatan ketebalan endometriun tikus dengan pewarnaan *Haemotoxilin Eosin* pada tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak Bit merah dengan sayatan tranversal dilihat menggunakan mikroskop Olympus XC 10 dengan pembesaran 20x lapang pandang. Kemudian di ukur ketebalan menggunakan *live-auto exported to microsoft excel*. Pengukuran ketebalan endometrium diukur pada 10 titik, yaitu 5 titik ketebalan tertinggi dan 5 titik ketebalan terendah. Perhitungan dilakukan oleh 2 orang termasuk peneliti sendiri. Dapat dilihat pada gambar bahwa endometrium tikus betina putih lebih tebal dari pada lapisan miometrum dan perimetrium. Hal ini sejalan dengan penelitian Harlita, dkk (2015) bahwa pemberian ekstrak kulit Biji mete (*Anacardium occidentale L.*) tampak perubahan histologis uteru tikus putih pada endometrium berukuran lebih tebal dari miometrium dan dapat mencegah terjadi infertilitas. Hal ini berbeda dengan endometrium normal wanita mempunyai ketebalan yang bervariasi yaitu mulai dari 0,5 mm sampai 5 mm yang terdiri dari epitel permukaan, kelenjar dan jaringan mesenkin intraglandular yang terdapat banyak pembuluh darah (Cunningham *et al*, 2005)

Secara keseluruhan penelitian ini bahwa pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan dosis 125 mg/KgBB/hari, 250 mg/KgBB/hari dan 500 mg/KgBB/hari dapat berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi reseptor estrogen α dan peningkatan ketebalan endometrium pada tikus putih *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebanyak 2 batang/hari selama 56 hari. Ekstrak Bit merah dengan dosis 500 mg/KgBB/hari terbukti lebih meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α di endometrium dan ketebalan endometrium pada tikus betina putih yang dipapar asap rokok dibandingkan dengan kelompok PI dan kelompok PII.

Pada Tabel 5.6 dapat dikatakan bahwa ada hubungan antara dosis dan efek Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan peningkatan reseptor estrogen α dan peningkatan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok. Artinya ada hubungan/korelasi yang bermakna antara ekspresi reseptor estrogen α dengan ketebalan endometrium ($p\text{-value}=0.000<\alpha$) pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok + ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) ($n=15$) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang kuat yaitu $r = 0.745$. Nilai positif pada koefisien korelasi 0.745 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila terjadi peningkatan ekspresi reseptor estrogen α maka akan berakibat terjadi pula peningkatan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus norvegicus* sebagai efek dari perlakuan paparan asap rokok. Demikian pula sebaliknya, bila ekspresi reseptor estrogen α turun maka ketebalan endometrium akan menurun pula pada tikus betina *Rattus norvegicus* sebagai efek dari pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) + paparan asap rokok. Jadi ada hubungan antara dosis dan efek Bit merah (*Beta vulgaris L*) dengan peningkatan ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada tikus betina yang dipapar asap rokok.

6.3 Keterbatasan Penelitian

1. Peneliti mempunyai keterbatasan selama proses penelitian, diantaranya peneliti belum dapat mengetahui secara pasti dosis yang aman pemberian ekstrak Bit merah pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Peneliti hanya melakukan pengamatan ekspresi reseptor estrogen α tanpa mengamati hormon reseptor yang lain yang dapat menyebabkan infertilitas.
3. Peneliti harus menunggu siklus estrus tikus pada fase proestrus karena fase proestrus tikus tidak sama dan pembedahan baru dapat dilakukan bila tikus tersebut dalam fase proestrus dan siklus estrus tikus tidak sama pada setiap tikus.
5. Penelitian ini belum sampai mengamati kejadian infertilitas tetapi hanya mengamati ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium saja.

6.4 Implementasi Kebidanan

Pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α di endometrium dan meningkatnya ketebalan endometrium pada tikus betina putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok, sehingga berdampak baik bagi masyarakat dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada manusia agar dapat di aplikasikan pada manusia guna menurunkan kasus infertilitas pada wanita.

Implementasi kebidanan hasil penelitian ini adalah meningkatkan kesadaran masyarakat akan pentingnya menjaga kesehatan reproduksi dengan penting berperilaku hidup sehat dan lingkungan sehat dengan cara bebas asap rokok. Melakukan sosialisasi dan konseling kepada masyarakat baik perokok aktif maupun perokok pasif bahwa paparan asap rokok dapat menyebabkan infertilitas, gangguan haid, abortus pada wanita hamil, dan menopause dini.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terbukti dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen α pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Pemberian ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) terbukti dapat meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus betina *Rattus Norvegicus* yang di papar asap rokok.

7.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya agar melakukan uji toksisitas ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.
2. Kepada peneliti lain agar melakukan penelitian selanjutnya dengan meningkatkan dosis tentang pengaruh ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*) pada berbagai organ tikus betina *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok.
3. Disarankan untuk meneliti selanjutnya mengenai efek negatif paparan asap rokok terhadap kadar hormon progesteron pada endometrium setelah diberikan ekstrak Bit merah (*Beta vulgaris L*).
4. Diharapkan penelitian berikutnya agar mengamati kejadian infertilitas pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhassan, A., Ziblim, A.R, and Muntaka, S. 2014. A Survey on depression among infertile women in Ghana. *Journal BMC Womens health* 14:42.
- Agarwal, A., Anamar, A., Premkumar B.J., Shaman, A., and Gupta, S. 2012. The Effect Oxidative Stress in female reproduction: A Review. *Journal Reproductive Biology and Endocrinology* 10: 49.
- Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat (Balittas). 2010. Kandungan kimia tembakau dan Rokok. Buletin Tanaman Tembakau, serat dan minyak industri. Malang.
- Budani, M.C., and Tiboni, G.M. 2017. Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. Elsevier. *Reproductive Toxicology* 72: 164-181.
- Camlin, N.J., McLaughlin, E.A., Holt, J.E. 2014. Through the smoke: Use of in vivo and in vitro cigarette smoking models to elucidate its effect on female fertility. *Toxicology and Applied Pharmacology* 281(2014): 266–275.
- Clifford, T., Howatson, G., West, D.J., Stevenson E.J. 2015, The Benefits of Red Beetroot Potential Supplementation in Health and Disease. *Nutrients* 7: 2801-2822.
- Cunningham, F.G., Giant N.F., Leveno K.J., Gilstrap L.C., Hauth J.C., Wenstrom K.D. 2005. *Obstetri Williams*. Edisi 21. Vol 1. Jakarta. EGC.
- Dechanet, C., Anahory, T., Daude, M.J.C, Quantin, X., Reyftmann, L., Hamamah, S. 2011. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Human Reproduction* 17(1): 76-95.
- Departemen Kesehatan RI. 2015. Info Datin Hari tanpa Tembakau Sedunia (<http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-hari-tanpa-tembakau-sedunia.pdf>). Diakses tanggal 15 Agustus 2017.
- Erwinanto, 2004. *Hubungan Pertumbuhan Folikel, Kadar Eestradiol dan Ketebalan Endometrium Hasil Induksi Ovulasi*. Tesis Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetri Ginekologi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Eroschenko, V. 2012. *Difore's Atlas of Hystology with Fuctional Correlations*. William and Wilkins (Editor). 2008. 11th Ed. Brahm U (Penterjemah) 2012. Atlas Histologi. Edisi 11. EGC. Jakarta. p.472-279.
- Gamal, E.A., Alsaid, M., Raish, M., dan Sohaibani, M., Beetroot (Beta vulgaris L.) Extract Ameliorates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity Associated Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rodent Model. *Journal Mediator of Inflammation* 12, id 983952.
- Ganong, W.F. 2010. *Review of Medical Physiology*. Twenty Third Edition. Mc Graw hil. hal.412-413.

- Gannon, A.M., Martin, R., dan Foster, W.G., 2011. Cigarette Smoke Exposure Leads to Follicle Loss via an Alternative Ovarian Cell Death Pathway in a Mouse Model. *Toxicological journal* 1: 274-284.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., and Choo, W.S. 2015. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *Journal Food Science and Technology* **64**(2): 645-649.
- Greabu, M., Battino, M., Totan, A., Mohora, M., Mitrea, N., Totan, C., Tudor Spinu, T., Didilescu, A. 2007. Effect of gas phase and particulate phase of cigarette smoke on salivary antioxidants. What can be the role of vitamin C and pyridoxine. *Pharmacological Report* 59:613-618.
- Greenstein B & Wood D. 2006. *At a Glance: Sistem Endokrin*. Jakarta: Erlangga. hal. 66-86.
- Guyton, A.C., & Hall, J.E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Thirteenth Edition. University of Mississippi Medical Center. p. 1039-1046
- Halliwell & Gutteridge, 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press Inc. hal. 42-72.
- Hanafiah, K.A. 2012. *Rancangan percobaan, Teori dan aplikasi*. Edisi 3. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Haris, A., Ikhsan, M., Rogayah, R. 2012. Asap Rokok sebagai Bahan Pencemar dalam Ruangan. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. CDK-189(39): 1.
- Harlita., Probosari, R.M., dan Ariyanto, J. 2015. Perubahan Histologis Uterus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar: Aktifitas Antifertilitas Ekstrak Kulit Biji Mete (*Anacardium occidentale* L.). *Journal Edukasi* 8(2): 1-4.
- Hasan., Iqbal, M. 2012. *Pokok-Pokok Materi Statistik 2 (Statistik Inferensial)*. (Edisi kedua, cetakan ketujuh). Jakarta: Bumi Aksara.
- Hecht, F., Pessoa, C.F., Gentile, L.B., Rosenthal, D., & Denise P. Carvalho, D.P., Fortunato, R.S. 2016. Review: The Role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *International Society of Oncology and BioMarkers*.
- Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Goto, W., Orimo, A., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y., and Muramatsu, M. 1996. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* 22(1): 37-44.
- Indu, R., Adhikari, A., Ray, M., Alok K. Hazra, A.K., Tapas, K. Sur, T.K., and Das, A.K. 2017. Antioxidant properties of polyphenolic rich HPLC standardized extract of *Beta vulgaris* L. roots. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science*. **6**(3): 2619-2624.
- Junquera, L.C and Carneiro, J. 2007. *Basic Hystology: Text dan Atlas*. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta.

- Kinanti, V.N., Yamin, M, Aksara, L., F. 2016. Prototype penyaring asap rokok pada smoking area menggunakan pulse width modulation (PWM) dan Fuzzy Tsukamoto. *SemanTIK* 2(1): 195-202.
- Khorram, O., Han, G., and magee, T. 2010. Cigarette smoke inhibits endometrial epithelial cell proliferation through a nitric oxide-mediated pathway. *American Society for Reproductive Medicine* 93(1).
- Kumar, P.S., Bhaumik, A., Chopra, M., and Devi, K.N. 2016. Evaluation of Anti Diabetic activity of Ethanolic Extract of Beet Root (EEBT-Beta Vulgaris) Againsts Streptozocin Induced Diabetic Rats. *Journal of Drug Discovery and Therapeutic* 4(37): 01-06.
- Kumar Y. 2015. Betroot: A Super Food. *International Journal of Engineering Studies and Technical Approach* 1(3).
- Lee, H., Kim, C., Hwang, K., Sung, J., Lee, J., Choi K. 2017. Cigarette smoke impaired maturation of ovarian follicles and normal growth of uterus inner wall of female wild-type and hypertensive rats. *Reproductive Toxicology* 9 (2017).
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8).
- McDonnell, D.P. & Norris, J.D., 2002. Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor. *Mapping Cellular Signaling* 269: 1642-1643.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P., 2002. Determination of Estrus Cycle Phase of Rats: Some Helpful Consideration. *Brazilian Journal of Biology* 62(4): 611-613.
- Mereddy, R., Chan, A., Fanning, K., Nirmal, N., Sultanbawa, Y. 2016. Betalain Rich Functional Extract with Reduced Salts and Nitrate Content from Red Beetroot (Beta Vulgaris L) using membrane Separation Tecnology. *Elsivier. Food Chemistry* 215(2017): 311-317.
- Miraj, S. 2016. Chemistry and pharmacological effect of beta vulgaris: A systematic review. *Scholars Research Library. Der Pharmacia Lettre* 8 (19):404-409.
- Mylonas, I., Jeschke, U., Shabani, N., Kuhn, C., Krigel, S., Kupka, M.S., Friese, K., 2005. Normal and Maglinant Human Endometrium Express Immunohistochemically Estrogen Receptor Alpha (ER- α), Estrogen Receptor Beta (ER- β) and Progesterone Receptor (PR). *Anticancer Research* 25:1679-1686.
- Naserzadeha, P., Hosseinib, M., Asla, B.M, and Pourahmada, J. 2014. Toxicity Mechanisms of Cigarette Smoke on Mouse Fetus Mitochondria. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14: 131-138.
- Neal, M.S., Hughes, E.G., Halloway, A.C., dan Foster, W.G. 2005. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Human reproduction* 20(9): 2531-2535.

- Ninfali, P., and Angelino, D. 2013. Review Nutritional and Functional Potential of Beta Vulgaris Cicla and Rubra. Elsevier. *Journal Fitoterapia* **89**: 188-199.
- Nursyah, D.A. 2012. *Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (Rattus norvegicus) Ovarioktomi Yang Diberi Tepung Daging Teripang (Holothuria scabra)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Olooto, W.E., Amballi, A.A., and Banjo, T.A. 2012, A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **2**(3):379-385.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PPRI). 2012. Pengamanan Bahan yang mengandung Zat Adiktif berua Produk Tembakau bagi Kesehatan. Nomor 109.
- POGI (Perkumpulan Obstetri dan Ginekologi Indonesia). 2013. Konsensus penanganan infertilitas. POGI: Jakarta. p.1-17.
- Prasad S., Gupta, S.C., Tyagi A.K. 2017. Mini-review Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*. **387**: 95-105.
- Prayogha, P. 2012. Profil Hormon Ovari Sepanjang Siklus Estrus Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR). Skripsi. Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Raupa, Z., Polikandrioti, M., Sotiropoulou, P., Faros, E., Koulouri, A., Wozniak, G. 2009. Causes of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal* **3**(2): 80-87.
- Ratnawati, R.S.N., Saputri, I.N., Ratnawati, R., Soeharto, S., dan Wiyasa, I.W.A. 2014. The effect of Alpha tocopherol on oxidative stress and ovarian function in Rats exposed to tobacco smoke. *Medical journal* **39**(2): 203-312.
- Rzymiski, P., Rzymiski, P., Tomczyk, K., Niedzielski, P., Jakubowski K., Poniedziałek, B. 2014. Metal status in human endometrium: Relation to cigarette smoking and histological lesions. *Enviromental Research*. **132** (2014): 328-333.
- Santoso, Singgih. 2005. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. Jakarta: Elex Media Komputindo (Gramedia).
- Setiawan, M.A.W., Nugroho, E.K., Lestario, L.N. 2015. Ekstraksi Betasinin dari Kulit Umbi (Beta Vulgaris) sebagai bahan Pewarna Alami. *Jurnal Ilmu Pertanian*.
- Seyedeh, N.S.S., Fahimeh, M.G., Sina, K.J., Muhammad, A.H., Mustafa, H. 2013. Melatonin protects uterus and oviduct exposed to nicotine in mice. *Journal Toxicology* **7**(1): 41-46.
- Sperrof, L., Glass, R.H., Kase, N. G. 1999. *Clinical Gynecologyc Endocrinology and Infertility*: Lippincott Williams and Wilkins. Edisi 6. P52-66.

- Speroff, L., Fritz, M.A. 2005. *Female Infertility In: Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*. Seventh edition, PA: Lippincott Williams and Wilkins. Edisi 6. Hal 52-56.
- Steel, Robert G.D. dan Torrie, James H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika suatu pendekatan biometric*. (Terjemahan Bambang Sumantri). Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Suardi, R.B. 2016. Pengaruh Ekstrak kacang Panjang (*Vigna sinensis*, L.) terhadap jumlah kelenjar dan ketebalan endometrium Tikus Putih betina (*Rattus norvegicus*, L). *Jurnal Biologi UNY* 5(3): 33-40
- Sudha, G., dan Reddy, K., S., N. 2013. Causes of Female Infertility: A Crossectional Study. *International journal of latest research in science and tecnology* 2(6):119-123.
- Tadimalla, R.T. 2017. 10 serious side effect of beetroot <http://www.stylecraze.com/articles/serious-side-effects-of-beetroots/>. Diakses tanggal 11 november 2017.
- Talbot, P., Riveles, K. 2005. Review. Smoking and Reproduction: The Oviduct as Target of Cigarette smoke. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3 (52).
- Tanaka, Y., Sasaki, N., anda Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: antochyanins, betalains and carotenoids. *The plant journal* 54(4): 733-749.
- Totonchia, H., Miladpoura, B., Poura, Z.M., Khademia, F., Kasraeian, M., and Zala, F. 2016. Quantitative analysis of expression level of estrogen and progesterone receptors and VEGF genes in human endometrial stromal cells after treatment with nicotine. *Journal Toxicology Mechanisms and Methods* 26(8): 595-600.
- Tuttle, A.M., Stampfli, M., and Foster, W.G. 2009. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Human Reproduction* 24(6): 1452–1459.
- Utami, S.W. 2016. *Pengaruh antosianin ubi jalar ungu (Ipomea batata L) varietas ungu terhadap ekspresi reseptor estrogen α dan ketebalan endometrium pada uterus tikus putih (Rattus norvegicus) betina yang dipapar asap rokok*. Tesis. Program studi magister kebidanan FKUB Malang.
- Valko, M., Leibfritz, L., Moncol, J., Cronin, T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:50-51.
- Vulic, J.J., Cebovi, T.N., Canadanovic, J.M., Cetkovi, G.S., Brunet, J.M., Canadanovic, V.M., Djilas, S.M. 2013. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Journal of Functional Food* 6(2014): 168-175.
- Werdhasari, S. 2014. Peran Antioksidan bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 3(2): 59-68.

- Westwood, F.R., 2008. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology* 36: 377-381.
- Wigand, J.S. 2006. Additives Cigarette Design and Tobacco Product Regulation. A Report to: World Health Organization Tobacco Free Initiative Tobacco Product Regulation Group. Japan.
- Zhou, Y., Jorgensen, E.M., Gan, Y., and Taylor, H.S. 2011. Cigarette Smoke Increases Progesterone Receptor and Homebox A10 Expression in Human Endometrium and Endometrial Cells: A Potential Role in Decreased Prevalence of Endometrial Pathology in Smokers. *Journal Biology of Reproduction* **84**: 1242-1247.
- Yuwono, S.S. 2016. Tanaman Bit (Beta Vulgaris L). Di <http://darsatop.lecture.ub.ac.id/2016/01/tanaman-bit-beta-vulgaris-l/>. Akses Tanggal 18 Juli 2018.

